

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Regeneração nervosa e recuperação funcional após eletroestimulação
muscular e exercício de natação na fase aguda da axoniotmese**

Larissa Salgado de Oliveira

2008

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LARISSA SALGADO DE OLIVEIRA

**REGENERAÇÃO NERVOSA E RECUPERAÇÃO
FUNCIONAL APÓS ELETROESTIMULAÇÃO
MUSCULAR E EXERCÍCIO DE NATAÇÃO NA
FASE AGUDA DA AXONIOTMESE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção Fisioterapêutica. Linha de Pesquisa: Plasticidade Neuromuscular e Desenvolvimento Neuromotor: Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosana Macher Teodori.

PIRACICABA
2008

Ficha Catalográfica

Oliveira, Larissa Salgado.

Regeneração nervosa e recuperação funcional após eletroestimulação muscular e exercício de natação na fase aguda da axoniotmese. Piracicaba, 2008. 128p.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Macher Teodori.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba.

1. Desnervação. 2. Regeneração Nervosa. 3. Eletroestimulação Muscular 4. Exercício Físico 5. Índice Funcional do Ciático (IFC) 6. Morfometria I. Teodori, Rosana Macher. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Jonatan e Maria do Socorro, por acreditar no meu potencial e investir no meu crescimento profissional e aos meus irmãos, Michael e Diego, pelo conforto, confiança e apoio. Dedico também ao meu namorado, Rodrigo, pela cumplicidade, incentivo e apoio incondicional. Amo vocês. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força que sempre encontrei nele, ajudando-me a acreditar e continuar lutando pelos meus ideais.

À minha família que, apesar da distância, estiveram sempre presentes nesta caminhada fazendo parte de tudo que construí até hoje e me amparando nos momentos mais difíceis, em especial meus avós e meu sobrinho Enzo.

À FAPESP (05/52720-0) e ao FAP–UNIMEP (384/05) pelo apoio financeiro.

À Capes/ Prosup pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Rosana Macher Teodori, meu agradecimento especial pela dedicação, incentivo, amizade, confiança e acima de tudo, por ser uma grande pesquisadora, que compartilha com competência seus conhecimentos e experiências.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Guirro, Prof^a Dr^a Viviane Balisardo Minamoto, Prof. Dr. Marco César Somazz e Prof^a Dr^a Maria Imaculada Montebelo, muito obrigada pela dedicação, atenção constante e contribuições neste trabalho.

As amigas Luciane Sobral, Sibeles Takeda, Joice Betini, Gabriela Silva e Helena Gonçalves, do Laboratório de Plasticidade Neuromuscular, pelo companheirismo e imprescindível participação neste trabalho.

Um agradecimento especial às amigas Luciane Sobral e Clívia Bandeira pelo convívio agradável, apoio e principalmente pela amizade que construímos durante toda essa etapa de nossa vida.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação Dulce e Angelise e à secretária Miriam Castro, pela disponibilidade e constante dedicação.

A todos os amigos do mestrado que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

RESUMO

A eletroestimulação muscular fásica de baixa frequência (EMFBB) e o exercício físico são utilizados na reabilitação da lesão nervosa periférica, porém, suas influências sobre a qualidade da regeneração nervosa e recuperação funcional são pouco discutidas. Este estudo avaliou a influência de um protocolo de EMFBB, do exercício de natação livre, bem como da associação entre ambos, sobre as características morfológicas e funcionais do nervo isquiático regenerado após axoniotmese. Trinta e seis ratos *Wistar* machos ($222,05 \pm 42,2g$), foram divididos em 6 grupos ($n=6$): Controle (C), Desnervado 6 dias (D6), Desnervado (D), Desnervado+Eletroestimulação (DE), Desnervado+Natação (DN) e Desnervado+Natação+Eletroestimulação (DNE). Previamente à desnervação, os grupos DN e DNE foram adaptados à natação (5 dias consecutivos). Em seguida, o nervo isquiático esquerdo foi esmagado (4 pinçamentos de 20s). O grupo C não sofreu intervenção e o D6 teve o nervo analisado histologicamente após 6 dias. Após 24 horas da lesão, os animais dos grupos DE e DNE tiveram o músculo sóleo esquerdo eletroestimulado (corrente bifásica quadrada simétrica; $T=3ms$; $f=10Hz$; $i=5mA$; 30 min/dia, durante 22 dias). Os animais dos grupos DN e DNE foram submetidos à natação ($T^{\circ} = 31 \pm 2^{\circ}C$; 30 min/dia; por 22 dias), sem carga adicional. Realizou-se o registro da marcha (pré-operatório, 7^o, 14^o e 21^o dias pós-operatório - PO). Foram obtidas as distâncias: entre a extremidade do 3^o dedo e calcâneo - PL; entre o 1^o e o 5^o dedo - TS e entre o 2^o e 4^o dedo - ITS em ambas patas. Cortes transversais ($1\mu m$) do nervo isquiático permitiram obter o número de axônios, diâmetro dos axônios e das fibras nervosas, espessura da bainha de mielina e razão G. Utilizou-se os testes ANOVA *Two-way* para análise intragrupos e ANOVA *One-way* para análises intergrupos, seguidos de Tukey HSD ($p<0,05$). Aplicou-se os Testes de correlação de Spearman e de Pearson ($p<0,05$). O número de axônios regenerados nos grupos desnervados foi maior que no grupo C ($p<0,01$), sendo que no grupo DE foi maior que no grupo D ($p<0,05$). O diâmetro dos axônios foi menor nos grupos desnervados comparado ao grupo C ($p<0,01$), porém, no grupo DN foi maior que no grupo D ($p<0,05$). O diâmetro das fibras e a espessura da bainha de mielina nos grupos desnervados foram menores em relação ao C ($p<0,01$). A razão G foi semelhante entre os grupos ($p>0,05$). Na análise do Índice Funcional do Ciático (IFC) intragrupos, os valores do 7^o e 14^o dias PO foram menores que no pré-operatório e 21^o dia PO ($p<0,01$), porém somente o grupo DNE no 21^o dia ($21,44 \pm 14,71$) diferiu do pré-operatório ($2,28 \pm 11,27$), enquanto entre os grupos não houve diferença ($p>0,05$). Não houve correlação entre os dados morfométricos e funcionais. Os protocolos de natação e EMFBB aplicados individualmente não interferiram no grau de maturação das fibras nervosas regeneradas, nem na recuperação funcional. A EMFBB aplicada favoreceu o brotamento axonal. A associação dos tratamentos atrasou a recuperação funcional, mesmo não tendo influenciado a regeneração nervosa.

Palavras Chaves: Desnervação, Regeneração Nervosa, Eletroestimulação Muscular, Exercício Físico, Índice Funcional do Ciático (IFC), Morfometria.

ABSTRACT

The muscle phase low frequency electrical stimulation (PLFES) and the physical exercise are used in the peripheral nervous injury rehabilitation, however, its influences on the quality of nerve regeneration and functional recovery are little discussed. This study evaluated the influence of a PLFES protocol, of the free swimming exercise, as well as the association between both, on the morphologic and functional characteristics of the sciatic nerve regenerated after axonotmesis. Thirty six males Wistar rats ($222,05 \pm 42,2g$) were divided in 6 groups ($n=6$): Control (C), Denervated 6 days (D6), Denervated (D), Denervated + Electrical stimulation (DE), Denervated + Swimming (DS) and Denervated + Swimming + Electrical stimulation (DSE). Previously to the denervation, DS and DSE groups were adapted to swimming (5 days in a row). Then, the left sciatic nerve was crushed (4 clamps of 20s). The C Group did not suffer intervention and the D6 had the nerve histologically analyzed after 6 days. After 24 hours of the injury, the animals of DE and DSE groups had the left soleus muscle electrical stimulated (biphasic symmetrical square shaped current; $T=3ms$; $f=10Hz$; $i=5mA$; 30 min/day, during 22 days). The animals of DS and DSE groups were submitted to swimming ($T^{\circ} = 31 \pm 2^{\circ}C$; 30 min/day; per 22 days), without additional load. It was performed the hind footprints (pre-operative, 7th, 14th and 21st days post operative - PO). The distances gotten: between the 3rd finger extremity and calcaneus - PL; between the 1st and the 5th finger - TS and between the 2nd and 4th finger - ITS in both legs. Transversal sections ($1\mu m$) of the sciatic nerve allowed to get the axons number, diameter of the axons and the nervous fibers, myelin thickness and G-ratio. Two-way ANOVA test was used for the intra-groups analysis and ANOVA One-way for inter-groups, followed by Tukey HSD ($p<0.05$). The Spearman and Pearson tests was applied ($p<0.05$). The number of regenerated axons in the denervated groups was greater than the C group ($p<0.01$), by being that in the DE group was greater in the D group ($p<0.05$). The axons diameter was smaller in the denervated groups compared to C group ($p<0.01$), but in DS group was greater than in the D group ($p<0.05$). The fibers diameter and the myelin thickness in the denervated groups were smaller in relation to C ($p<0.01$). The G-ratio was similar between the groups ($p>0.05$). In the intra-groups Sciatic Functional Index (SFI) analysis, the values of 7th and 14th days PO were smaller than in the pre-operative and 21st day PO ($p<0.01$), but only the DSE group in the 21st day (21.44 ± 14.71) differed from pre-operative (2.28 ± 11.27), while among the groups there was no difference ($p>0.05$). There was no correlation between the functional and morphometric data. The swimming and PLFES protocols applied individually did not interfere in the level of regenerated nerve fibers maturation, not even in the functional recovery. The PLFES applied was effective to the axonal growing. The association of the treatments delayed the functional recovery, even not having influenced the nerve regeneration.

Key words: Denervation, Nerve Regeneration, Muscle Electrical Stimulation, Physical Exercise, Sciatic Functional Index (SFI), Morphometry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 ESTRUTURA DO NERVO	12
2.2 TIPOS DE LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA	14
2.3 PROCESSOS DE DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA ...	18
2.4 CONSEQÜÊNCIAS DA DESNERVAÇÃO	24
2.5 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA	28
2.6 EXERCÍCIO FÍSICO E REGENERAÇÃO NERVOSA	35
2.7 PERSPECTIVAS DE RECUPERAÇÃO FUNCIONAL	43
3 OBJETIVO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 ANIMAIS	48
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	48
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	49
4.3.1 Índice Funcional do Ciático (IFC)	49
4.3.2 Protocolo de Esmagamento do Nervo Isquiático	50
4.3.3 Protocolo de Estimulação Elétrica (EE)	53
4.3.4 Protocolo de Natação Livre (NL)	54
4.3.5 Coleta e Processamento do Nervo Isquiático	56
4.4 ANÁLISE DOS DADOS	57
4.4.1 Análise Morfométrica	57
4.4.2 Quantificação dos Axônios	60
4.4.3 Análise Funcional da Marcha	61
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
5 RESULTADOS	64
5.1 ESTUDO PILOTO	64
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA	65
5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA	67

5.3.1 Número de Axônios	67
5.3.2 Análise Morfométrica	68
5.4 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA	72
5.4.1 Análise Intragrupos	72
5.4.2 Análise Intergrupos	73
5.4.3 Análise dos Registros das Pegadas	74
5.5 CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS E O IFC	77
6 DISCUSSÃO	81
6.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	81
6.2 MODELO DE LESÃO E PERÍODO DE ANÁLISE	82
6.3 PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA.....	85
6.4 PROTOCOLO DE NATAÇÃO LIVRE	89
6.5 REGENERAÇÃO AXONAL E MORFOMETRIA	93
6.6 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA	100
6.7 CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS E O IFC	107
7 CONCLUSÕES	111
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
REFERÊNCIAS	114
ANEXO	127

1 INTRODUÇÃO

Devido à sua distribuição, os nervos são alvos freqüentes de lesões traumáticas (Machado, 2000), cujas causas mais comuns são os acidentes automobilísticos e as lesões esportivas, seguidas de traumas penetrantes e lesões ao nascimento por tração excessiva (Welch, 1996; Daneyemez, Solmaz e Izci, 2005).

A lesão nervosa promove alterações sensitivas, motoras e autonômicas, que variam com o grau e extensão da lesão e interferem com a funcionalidade (Welch, 1996, Machado, 2000). O restabelecimento precoce da conexão com o músculo é importante para a recuperação funcional, pois quanto mais precoce a reinervação, melhor o prognóstico (Eberstein e Eberstein, 1996).

O desenvolvimento de modelos experimentais de lesões nervosas periféricas, como o esmagamento, estiramento e secção, tem contribuído para a compreensão das alterações morfológicas e fisiológicas do sistema neuromuscular, permitindo avaliar a lesão em si, o processo de regeneração e a possível recuperação funcional (Mira, 1979; Mazzer et al., 2006).

A regeneração nervosa e conseqüente recuperação funcional é um processo lento e depende da extensão, natureza e grau da lesão (Eberstein e Eberstein, 1996; Robinson, 2000; Lundy-Ekman, 2004). Diferentes recursos podem ser utilizados no sentido de viabilizar essa recuperação, como a estimulação elétrica muscular fásica de baixa freqüência (Fernandes et al., 2005; Russo et al., 2007), estimulação elétrica muscular crônica de baixa freqüência (Dow, Faulkner e Dennis, 2005), ultra-som (Monte-Raso et al., 2006) e o exercício físico (Sarikcioglu e Oguz, 2001; Byun et al., 2005).

A maioria dos estudos experimentais aborda a estimulação elétrica crônica, caracterizada por períodos de intervenção superiores a 8 horas diárias, utilizando eletrodos implantados. Embora este tipo de estimulação seja incomum na clínica, trabalhos experimentais apontam benefícios ao músculo desnervado, como a manutenção de suas propriedades contráteis e metabólicas (Eberstein e Pachter, 1986; Dow et al., 2004). Por outro lado, há relatos de que a reinervação muscular pode ser inibida quando a estimulação elétrica é aplicada ao músculo, devido à redução da oferta de fatores tróficos aos axônios em regeneração (Lieber, 2002; Love, Son e Thompson, 2003). Outros estudos apontam que a estimulação elétrica, quando aplicada no nervo proximal à lesão, pode facilitar o crescimento de axônios em regeneração (Brushart et al., 2002; Gordon, Sulaiman e Boyd, 2003).

O tratamento fisioterapêutico de lesões nervosas inclui a estimulação elétrica muscular fásica, caracterizada por aplicação de estímulos durante 20 a 30 minutos diários, utilizando principalmente eletrodos de superfície. Essa forma de intervenção pode manter a excitabilidade do músculo, a massa e a força muscular (Dow et al., 2004), minimizar a redução da área da fibra muscular (Fernandes et al., 2005) e a redução dos níveis de mRNA da atrogina -1 e myoD (Russo et al., 2007), o que pode favorecer a recuperação funcional após a reinervação.

Entretanto, pouco se discute sobre os efeitos da estimulação elétrica fásica aplicada ao músculo desnervado sobre a morfologia de nervos regenerados, desconhecendo-se sua influência sobre a regeneração nervosa.

O exercício físico é outro recurso terapêutico que favorece o restabelecimento das propriedades contráteis e metabólicas do músculo após desnervação (Possebon et al., 2001; Tanaka, Tsubaki e Tachino, 2005), previne

limitações permanentes decorrentes da atrofia muscular (Deschenes, Maresh e Kraimer, 1997), além de estimular a atividade funcional após reinervação (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974, 1980a,b).

Considerando esses benefícios, diversas formas de atividade física têm sido investigadas experimentalmente, visando o retorno da funcionalidade após lesão nervosa. Entretanto, poucos estudos citam o impacto do exercício físico, aplicado na fase aguda da lesão (dentro da primeira semana) sobre o processo de regeneração nervosa. Van Meeteren et al. (1997a), Byun et al. (2005) e Seo et al. (2006) citam que a mobilização iniciada de 12 a 72 horas após o esmagamento do nervo acelera o retorno da função sensório-motora na fase inicial da lesão e que estes benefícios persistem na fase tardia da recuperação do nervo. No entanto, tais estudos avaliam funcionalmente o nervo, não havendo dados que correlacionem a morfologia e a função após o exercício.

A intensidade do exercício é outra variável discutida, não havendo uma definição sobre a melhor intensidade de exercício para ratos desnervados (Deschenes, Maresh e Kraimer, 1997; Sakakima et al., 2004).

Considerando a carência de estudos relacionados a estes recursos, da forma como são aplicados na clínica, para demonstrar sua influência sobre a regeneração nervosa periférica, este estudo visa avaliar a influência da estimulação elétrica muscular, do exercício de natação e da associação entre ambos, sobre a regeneração do nervo isquiático de ratos após lesão por esmagamento, por meio de análise morfológica e funcional.

Os resultados poderão subsidiar a discussão da conduta fisioterapêutica em casos de lesão nervosa periférica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRUTURA DO NERVO

O sistema nervoso periférico é formado por axônios de neurônios sensoriais, motores somáticos e viscerais, terminações sensoriais especializadas e neurônios pós-ganglionares autônomos, cuja função é conectar o sistema nervoso central à periferia (Lundy-Ekman, 2004).

Um feixe de fibras nervosas paralelamente dispostas, constituído de axônios e envolvido por bainhas conjuntivas e células de Schwann, localizado na porção periférica do sistema nervoso, constitui o nervo. Essas fibras podem ser mielínicas ou amielínicas (Ide, 1996; Guyton e Hall, 2002).

Uma única célula de Schwann, contínua, envolve total ou parcialmente cerca de 5 a 25 axônios amielínicos, através de projeções citoplasmáticas, não havendo a formação da bainha de mielina. Estes axônios encontram-se individualmente alocados no interior de sulcos ou canais formados pelas expansões do citoplasma das células de Schwann, conferindo menor velocidade de condução ao impulso nervoso (Welch, 1996; Lee e Wolfe, 2000; Guyton e Hall, 2002; Lundy-Ekman, 2004).

Nas fibras mielínicas, as células de Schwann formam a bainha de mielina, uma estrutura tubular com múltiplas camadas, que envolve cada axônio. As células de Schwann estão separadas umas das outras, ao longo do axônio, por intervalos de aproximadamente 1 a 2 mm, destituídos de mielina e parcialmente cobertos por digitações laterais do citoplasma dessas células, os nodos de Ranvier, responsáveis por aumentar a velocidade de condução do impulso nervoso, por suportarem os rápidos processos de despolarização e

repolarização necessários à gênese dos potenciais de ação (Welch, 1996; Lee e Wolfe, 2000; Guyton e Hall, 2002; Ludy-Ekman, 2004). As células de Schwann são ainda revestidas por membrana basal, estrutura que atua no crescimento, maturação e orientação de axônios em regeneração (Ide, 1996).

Embora a bainha de mielina seja segmentada, o axônio é contínuo e o segmento da fibra que contém bainha de mielina e compreende a distância entre dois nodos de Ranvier consecutivos recebe o nome de internódulo. A espessura da bainha de mielina é proporcional ao diâmetro do axônio correspondente (Ide, 1996; Lundy-Ekman, 2004).

Anatomicamente, os nervos estão circundados por três bainhas de tecido conjuntivo distintas, que se interconectam: o endoneuro, o perineuro e o epineuro, que apresentam estrutura individual e característica peculiar e mantêm a nutrição e integridade das fibras nervosas (Welch, 1996; Evans, 2001).

O endoneuro é uma delicada camada de tecido conjuntivo frouxo que apresenta íntimo contato com as fibras nervosas e, através de suas paredes de suporte – os tubos endoneurais – mantém sua nutrição. O endoneuro é composto de capilares e fibras colágenas tipo III dispostas longitudinalmente em relação à fibra nervosa (Lundborg, 1987; Lee e Wolfe, 2000).

O perineuro (camada intermediária) é uma fina bainha de tecido fibroso, que envolve numerosas fibras nervosas formando fascículos e apresenta células pavimentosas fortemente unidas por zônulas de oclusão (*tight junctions*) que se dispõem em camadas concêntricas em relação às fibras nervosas. Entre as sucessivas camadas celulares são encontradas fibras colágenas tipo I e tipo III e fibras elásticas. O perineuro é importante na manutenção da homeostase do nervo, pois atua como barreira de difusão, auxiliando a preservação do

microambiente intrafascicular especializado, além de ter papel de proteção mecânica contra trauma externo, fornecendo ao nervo elasticidade e força tênsil (Welch, 1996; Lundy-Ekman, 2004).

O epineuro é a camada mais externa e envolve todos os fascículos que, unidos, compõem o nervo. Contém vasos, raramente tecido adiposo, apresenta fibras elásticas e colágenas tipo I em sua arquitetura e desempenha função de proteção dos axônios periféricos contra forças compressivas aplicadas ao nervo (Lundborg, 1987; Lee e Wolfe, 2000; Robinson e Snyder-Mackler, 2001).

O nervo possui um sistema microvascular intrínseco bem desenvolvido ao nível das bainhas conjuntivas, mantendo seus vasos interligados através de numerosas anastomoses. O sistema microvascular extrínseco compreende todos os vasos da região anatômica próxima ao tronco nervoso, cuja função é suprir a microcirculação intraneural. Essa estrutura intraneural funciona como um sistema de reserva, de forma a preservar o fluxo sanguíneo, mesmo quando o nervo sofre uma lesão mais grave (Lundborg, 1987; Lundy-Ekman, 2004, Pachioni et al., 2006).

O conhecimento das estruturas anatômicas que compõem o nervo é de extrema importância, devido ao seu papel ativo nos processos fisiológicos, moleculares e celulares, favorecendo a caracterização do tipo de lesão e sua gravidade (Burnett e Zager, 2004).

2.2 TIPOS DE LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Devido à sua distribuição e localização, os nervos são frequentemente traumatizados (Machado, 2000), havendo como consequência a diminuição ou perda da sensibilidade, da motricidade e das funções autonômicas no território

inervado (Welch, 1996; Machado, 2000; Lundy-Ekman, 2004; Monte-Raso et al., 2006).

A incidência de lesões nervosas periféricas geralmente é devida a acidentes automobilísticos, industriais e no esporte, seguida de traumas penetrantes, fraturas e lesões ao nascimento, ou tração excessiva (Welch, 1996; Robinson, 2000; Daneyemez, Solmaz e Izci, 2005).

De acordo com Daneyemez, Solmaz e Izci (2005), os nervos espinhais mais suscetíveis a lesões são os nervos mediano (32,3%), seguido do ulnar (24,1%), radial (12,1%), isquiático (10,7%) e fibular comum (7,7%) e raramente o nervo tibial e o femoral. Robinson (2000) cita que, no membro superior, o nervo mais suscetível à lesão é o radial e no membro inferior, o isquiático.

A classificação de trauma de nervo baseia-se no dano sofrido pelos componentes nervosos, na funcionalidade do nervo e na capacidade de recuperação espontânea (Burnett e Zager, 2004).

A lesão nervosa periférica foi classificada primeiramente por Seddon (1943) em três diferentes tipos, baseado no grau de ruptura das estruturas internas do nervo: neuropraxia, axoniotmese e neurotmeze (Welch, 1996; Evans, 2001; Ferreira, 2001; Burnett e Zager, 2004).

A neuropraxia é a forma mais branda e é devida a uma compressão local leve ou isquemia. Caracteriza-se por bloqueio transitório da condução nervosa, com leve acometimento local da bainha de mielina. Entretanto, a velocidade de condução proximal e distalmente à lesão permanece íntegra. Há preservação da continuidade do axônio e da arquitetura do nervo, não havendo degeneração Walleriana. A recuperação é completa e se dá espontaneamente em poucos dias ou semanas (Welch, 1996; Lee e Wolfe, 2000).

A axoniotmese é uma lesão mais grave, geralmente conseqüente ao esmagamento do nervo, sendo caracterizada por compressão severa ou contínua, que interrompe a continuidade axonal e a bainha de mielina no nível da lesão, porém, com preservação do tubo endoneural. Embora ocorra degeneração Walleriana distalmente à lesão, a microcirculação está preservada e as estruturas mesenquimais, incluindo o epineuro e perineuro, além das células de Schwann, estão intactas. O prognóstico é bom, pois a estrutura conjuntiva remanescente provê suporte para o brotamento axonal e reinervação (Robinson, 2000; Lee e Wolfe, 2000).

A neurotmese é o grau mais severo de lesão e ocorre quando os nervos são seccionados, por tração excessiva ou laceração. Caracteriza-se por completa ruptura do nervo, rompimento dos axônios, bainha de mielina, células de Schwann e envoltórios conjuntivos, em graus variáveis. A perda funcional é completa, portanto o prognóstico de recuperação funcional é desfavorável, a menos que a continuidade do nervo seja restabelecida. O tratamento requer intervenção cirúrgica para direcionar o crescimento axonal através dos tubos endoneurais (Lundborg, 1987; Ferreira, 2001; Burnett e Zager, 2004).

Sunderland (1978), citado por Burnett e Zager (2004), considerando a classificação proposta por Seddon, descreveu as lesões nervosas em cinco categorias, de acordo com sua severidade, afirmando haver prognósticos diferentes para neurotmese. Considerou a neuropraxia e axoniotmese de Seddon como graus I e II, respectivamente. Já a lesão de grau III, é caracterizada por uma transição entre axoniotmese e neurotmese, onde a continuidade do axônio é rompida por perda dos tubos endoneurais, mas o perineuro e epineuro estão preservados. Para lesões do tipo neurotmese, Sunderland dividiu-as em graus IV

e V, baseado no grau de envolvimento das estruturas de sustentação axonal.

Nas lesões grau IV, os fascículos nervosos (axônio, endoneuro e perineuro) são rompidos, exceto o epineuro, pois a continuidade do tronco nervoso é mantida. Todavia, ocorre cicatrização intraneural devido à desorganização da estrutura interna dos elementos do tecido conjuntivo. Os axônios em regeneração não entram nos tubos endoneurais apropriados que os conduziriam a seus órgãos terminais, mas em fascículos, terminando no tecido conjuntivo e formando neuromas. Nesse caso, é necessária a retirada do segmento lesado, com reparo cirúrgico ou reconstrução do nervo (Lee e Wolfe, 2000; Robinson, 2000; Ferreira, 2001; Burnett e Zager, 2004).

Em lesões de grau V há rompimento completo do nervo, com prognóstico ruim de recuperação funcional (Bridge et al., 1994; Burnett e Zager, 2004). Além do desalinhamento dos tubos endoneurais e a presença de hemorragia no perineuro, ainda há formação de cicatriz substancial no local da lesão, que ocorrem pelo acúmulo de uma quantidade variável de tecido composto de fibroblastos e células de Schwann que constituem uma barreira importante à recuperação (Lee e Wolfe, 2000; Robinson, 2000; Ferreira, 2001).

Dellon e Mackinnon (1989), considerando a possibilidade de ocorrer combinação entre os graus de lesão definidos por Sunderland, descrevem ainda o grau VI, que caracteriza as lesões nervosas mistas, onde todas as fibras são afetadas, porém em graus variáveis, como é comumente observado na clínica (Lee e Wolfe, 2000; Robinson, 2000; Evans, 2001).

Por fim, a extensão e o grau de lesão, bem como a resposta celular à lesão nervosa, definem o prognóstico do reparo nervoso e, conseqüentemente, da recuperação da função motora, uma vez que permitem correlacionar as

alterações microscópicas que ocorrem após a lesão com a sintomatologia dos pacientes (Evans, 2001; Burnett e Zager, 2004).

2.3 PROCESSOS DE DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Os processos de degeneração e conseqüente regeneração do nervo dependerão diretamente da gravidade da lesão original (Lee e Wolfe, 2000). Após esmagamento ou secção de um nervo, uma seqüência de eventos patológicos ocorre simultaneamente, como alterações bioquímicas, celulares, estruturais e moleculares, visando recuperar a função do nervo danificado (Burnett e Zager, 2004).

A lesão nervosa divide o axônio em dois segmentos: um proximal, em continuidade ao centro trófico da célula, e outro distal, separado do corpo celular (Bishop, 1982; Verdú et al., 2000; Lundy-Ekman, 2004). Imediatamente após a lesão, o protoplasma extravasa das extremidades seccionadas e os segmentos axonais se retraem, afastando-se um do outro (Lundy-Ekman, 2004).

Uma vez isolado do corpo celular, o segmento distal do axônio não mantém sua estrutura e integridade funcional, havendo aumento do influxo de íons cálcio e perda de potássio nas fibras, desencadeando-se um processo de degeneração axonal denominado degeneração Walleriana. Essa degeneração é marcada pela ação de proteases sobre os microtúbulos e neurofilamentos e é evidenciada pela desintegração e remoção dos restos de mielina e axônios, o que deixa o tubo endoneural vazio, como forma de preparar o ambiente para o crescimento, maturação e orientação dos axônios em regeneração (Bishop, 1982; Lundborg, 1987; Fawcett e Keynes, 1990; Lee e Wolfe, 2000).

Imediatamente após a lesão, as células de Schwann tornam-se ativas, sofrem mitoses, se diferenciam e regulam a expressão gênica das moléculas participantes dos processos de degeneração e regeneração (Welch, 1996; Verdú et al., 2000; Burnett e Zager, 2004). Concomitantemente, em conjunto com os macrófagos, elas desempenham um papel importante na degeneração Walleriana, auxiliando na remoção e fagocitose da mielina e axônios degenerados. Esse processo inicia 24 horas após o trauma e pode demorar de uma semana a vários meses. Entre 36 e 48 horas, as bainhas de mielina entram em processo intenso de desintegração. A continuidade dos axônios e a condução dos impulsos nervosos não são mais possíveis entre 48 e 96 horas após a lesão (Stoll, Jander e Myers, 2002; Burnett e Zager, 2004; Dubový, 2004).

Dentro de duas semanas após a lesão ocorre a proliferação de mastócitos, que liberam histamina e serotonina, as quais auxiliam no aumento da permeabilidade capilar e facilitam a migração de macrófagos ao local para auxiliar na fagocitose e remoção do axônio e mielina degenerados. Entre a 5^a e 8^a semana, o processo de degeneração geralmente está completo, restando apenas as fibras nervosas remanescentes com o endoneuro coberto por células de Schwann (Burnett e Zager, 2004).

Subseqüentemente, as células de Schwann, desprovidas de axônios, tornam-se alongadas e seus processos delgados se interdigitam com processos das células de Schwann vizinhas, formando cordões lineares denominados “Bandas de Büngner” no interior dos tubos de membrana basal. Nesta fase ainda é registrado o aumento da síntese de fatores neurotróficos e, como a lâmina basal das células de Schwann permanece íntegra durante a degeneração Walleriana,

serve de guia para o brotamento dos axônios durante a reinervação (Stoll e Müller, 1999; Dubový, 2004).

Em lesões mais extensas, a ausência das bandas de Büngner no segmento distal dificulta a regeneração axonal e normalmente resulta na formação de neuromas, tornando os brotamentos axonais ineficientes, de forma que o axônio em crescimento não atinge o órgão-alvo (Salonen et al., 1987; Fawcett e Keynes, 1990; Burnett e Zager, 2004). Portanto, a presença dessas colunas de células de Schwann explica os diferentes graus de regeneração entre os tipos de lesão (Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

Além da degeneração do axônio distal à lesão, a célula apresenta modificações morfológicas e estruturais ao longo do segmento proximal denominadas “efeito retrógrado”, que ocorrem nas primeiras 6 horas após a lesão e atingem o máximo em uma semana (Ferreira, 2001; Burnett e Zager, 2004). No segmento proximal, o axônio sofre degeneração que vai até o primeiro nódulo de Ranvier (Lundborg, 1987; Seckel, 1990; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

Dentre as modificações do corpo celular, a cromatólise central ou degeneração retrograda é um processo caracterizado pela dilatação do neurônio, levando à dissociação da substância de Nissl, desintegração de grandes porções do retículo endoplasmático rugoso, seguida da dispersão dos ribossomos no citoplasma. Além disso, observa-se aumento de volume do corpo celular e migração do núcleo para a periferia da célula (Fawcett e Keynes, 1990; Lee e Wolfe, 2000; Verdú et al., 2000). Simultaneamente, entre 24 e 48 horas da lesão, ocorre aumento no tamanho e número de células gliais, que parecem causar uma interrupção das conexões sinápticas do neurônio afetado com outras células (Ferreira, 2001; Burnett e Zager, 2004).

Fawcett e Keynes (1990) supõem que eventos fisiológicos celulares ligados à síntese protéica e ao transporte axoplasmático sejam responsáveis por alterações estruturais ocorridas no corpo celular, podendo promover tanto a regeneração (cromatossíntese) como a morte do neurônio.

As mudanças metabólicas estão relacionadas com a diminuição dos componentes do citoesqueleto transportados do corpo celular ao axônio, para produção de neurotransmissores necessários à ativação sináptica, produção de RNAm, lipídios e proteínas do citoesqueleto, como actina e tubulina, associadas ao crescimento e participantes do processo de reparo (Seckel, 1990; Welch, 1996; Lee e Wolfe, 2000).

O axônio se retrai a uma pequena distância logo após a secção. Há fragmentação da bainha do internódulo próximo à lesão e diminuição do diâmetro axonal. Porém, se a regeneração for satisfatória, o diâmetro do axônio se recupera. Caso contrário, a atrofia axonal aumenta (Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

É interessante destacar que existe uma interdependência entre o corpo celular e os axônios em termos de recuperação: o corpo celular não se recupera totalmente sem o restabelecimento das conexões periféricas funcionais e o calibre do axônio depende da recuperação do corpo celular (Burnett e Zager, 2004).

No início do processo regenerativo ocorre aumento da expressão de novos genes e da síntese protéica (Fawcett e Keynes, 1990). Dentre as proteínas, destacam-se a Proteína Associada ao Crescimento (GAPs) como a GAP-43, e as proteínas do citoesqueleto, como actina, tubulina e proteínas dos neurofilamentos. A GAP-43 serve como substrato da membrana dos cones de crescimento, sendo responsável pelo transporte axonal rápido, o que sugere a sua relação com a

reconstrução do axônio. Já, as proteínas do citoesqueleto responsáveis pelo transporte axonal anterógrado lento, estão relacionadas com alongamento axonal durante a regeneração (Fawcett e Keynes, 1990; Seckel, 1990; Ide, 1996; Lutz et al., 1999; Evans, 2001).

A regeneração inicia aproximadamente seis horas após a lesão (Ferreira, 2001). Logo, os axônios sobreviventes da porção proximal formam os primeiros brotos ou neuritos nos locais correspondentes aos nodos de Ranvier, que por esse motivo, recebem o nome de zona germinativa (Ide, 1996; Ferreira, 2001). Cada axônio emite 2 a 3 neuritos em direção ao órgão-alvo para reconexão e restabelecimento da função (Lundborg, 1987; Fawcett e Keynes, 1990; Ide, 1996).

A expansão distal da extremidade de cada neurito é o cone de crescimento, uma protuberância formada pelo acúmulo de estruturas como as mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e microtúbulos, originando vários filopódios ricos em actina que se movem ativamente, explorando o ambiente através de movimento amebóide (Lundborg, 1987; Fawcett e Keynes, 1990; Verdú et al., 2000; Burnett e Zager, 2004).

A interação do cone de crescimento e dos neuritos com as substâncias do meio extracelular até o alvo é um fator importante no processo de regeneração nervosa. Alguns autores demonstram a ação estimulatória de moléculas localizadas na matriz extracelular e citam o papel relevante que as células de Schwann desempenham devido às moléculas de sua membrana basal, que atuam como fatores promotores de neuritos, dentre elas a laminina e a fibronectina (Fawcett e Keynes, 1990; Seckel, 1990; Ide, 1996).

Ide (1996) relata que na fase de regeneração há aumento da expressão de moléculas de adesão celular neural (NCAM) e da N-caderina nas áreas axônio-axônio e na junção axônio-célula de Schwann, devido a sua relação com o crescimento axonal.

Entre outras moléculas sintetizadas pelas células de Schwann que merecem destaque na regeneração nervosa, incluem-se os fatores neurotróficos, que são polipeptídeos e podem ser divididos em duas classes: as neurotrofinas e as neurocitocinas. Dentre a família de neurotrofinas, destaca-se o fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofinas NT-3, NT-4/5 e NT6 e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF). Como exemplos de neurocitocinas, podem ser citados o fator neurotrófico ciliar (CNTF), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), interleucinas (IL) e o fator transformador de crescimento (TGF) (Evans, 2001; Dubový, 2004; Omura et al., 2005).

De forma ampla, estes fatores influenciam na atividade neural, incluindo-se a atividade sináptica; promovem o desenvolvimento durante o período embrionário; a manutenção e sustentação durante a vida adulta e a sobrevivência dos neurônios após a lesão nervosa (Omura et al., 2005). Sabe-se que após lesão nervosa ocorre interrupção do fornecimento desses fatores via transporte axonal retrógrado dos órgãos-alvo para o corpo celular. Os macrófagos estimulam e liberam interleucinas, que atuam como agentes quimiotáticos para as células de Schwann e estas passam a produzir tais fatores em níveis elevados por cerca de duas semanas, de forma a proteger os neurônios e estimular a regeneração axonal, inibindo a apoptose (Ide, 1996; Ceballos et al., 1999; Terenghi, 1999; Dubový, 2004; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

Diante dessas condições apropriadas, Gorio et al. (1983) citam que o aumento do brotamento e crescimento de neuritos, com formação de sinapses durante os primeiros dias de reinervação, indicam que o estímulo nervoso pode ser liberado ao músculo. Com a chegada do neurito ao músculo, inicia-se a reinervação do músculo, havendo a poliinervação. Assim que o contato sináptico é restabelecido, o nervo estimula o músculo a sintetizar acetilcolinesterase e diminuir a síntese de receptores extrajuncionais, diminuindo a liberação de fatores neurotróficos. A membrana pós-sináptica então desencadeia o mecanismo de eliminação sináptica, fornecendo substâncias que inibem o crescimento dos neuritos e, por sua vez, os neuritos regenerados transformam-se em terminal nervoso, enquanto o cone de crescimento é transformado em botão sináptico. A partir daí se estabelece a monoinervação.

Mesmo ao final desse processo, permanecem alterações morfológicas nos axônios regenerados, que sofrem modificações durante a fase de maturação. O calibre dos axônios regenerados e a espessura de suas bainhas de mielina aumentam, havendo recuperação progressiva da velocidade de condução nervosa e eficácia da transmissão sináptica (Verdú et al., 2000).

2.4 CONSEQÜÊNCIAS DA DESNERVAÇÃO

A unidade motora compreende o motoneurônio e todas as fibras musculares por ele inervadas (Lundy-Ekman, 2004). O mecanismo fisiológico de ativação muscular inicia quando os motoneurônios alfa despolarizam e o potencial de ação passa rapidamente ao longo de seus axônios, se difundindo através da fenda sináptica, onde a acetilcolina é liberada para se ligar aos respectivos

receptores na membrana pós-sináptica (Lundy-Ekman, 2004; Chen, Yu e Strickland, 2007).

A interrupção da comunicação nervo-músculo provoca perda imediata da atividade voluntária e reflexa do músculo, alterando a excitabilidade da membrana, que diminui seu potencial de repouso e as fibras musculares tornam-se hipersensíveis à acetilcolina (Nelson, Hayes e Currier, 2003; Ashley et al., 2005).

De acordo com o tipo de lesão nervosa periférica, a resposta do músculo à desnervação será transitória ou permanente (Robinson e Snyder-Mackler, 2001). Nesse sentido, diversos estudos demonstram que os eventos desencadeados pela desnervação são percebidos precocemente, logo no terceiro dia pós-desnervação e estão ligados a alterações na homeostasia energética, como a redução na sensibilidade à insulina, redução da expressão gênica dos transportadores GLUT1 e GLUT4, na capilarização das fibras musculares, proliferação de tecido conjuntivo intramuscular, hipotrofia muscular, redução das reservas de glicogênio, da força e da resistência à fadiga (Józsa et al. 1990; Deschenes, Maresh e Kraimer, 1997; Silva, Guirro e Cancellero, 2004).

Uma das características mais evidentes observadas após desnervação é a atrofia muscular, que pode variar consideravelmente entre espécies, entre indivíduos da mesma espécie, entre músculos do mesmo indivíduo e até entre fibras do mesmo músculo (Eberstein e Eberstein, 1996).

A atrofia muscular pode ser considerada um mecanismo de adaptação às condições impostas, na tentativa de reduzir a sobrecarga em uma região com pouca funcionalidade, ou como respostas das fibras musculares ao microambiente. A atrofia se deve à diminuição ou ausência da síntese protéica e

ao aumento da proteólise miofibrilar, acompanhadas pelo aumento de proteases lisossomais e de cálcio (Engel e Franzini-Armstrong, 1994; Lu, Huang e Carlson, 1997).

A desnervação também promove diminuição do diâmetro da fibra e da força muscular, devido à redução na quantidade de miofilamentos de actina e miosina. A ausência de estímulo nervoso sobre os músculos faz com que haja transformação de fibras no sentido de lenta para rápidas e, conseqüentemente, aumento da velocidade contrátil destas fibras (Pette e Staron, 2001; Sheffler e Chae, 2007). Johnson, Zoubos e Soucacos (2005) relatam que a transição dos tipos de fibras é dependente da inervação, mostrando que é o nervo quem determina o tipo de músculo (de contração rápida ou lenta).

Outra alteração observada após desnervação é o aumento de tecido conjuntivo, que acarreta prejuízos à função muscular, pois afeta a troca de materiais entre o leito vascular e as fibras musculares, além de afetar o crescimento axonal durante a reinervação (Lu, Huang e Carlson, 1997).

Em humanos, quando o tempo transcorrido da lesão nervosa é superior a cinco anos, a proliferação do tecido conjuntivo do músculo e a substituição por tecido adiposo são elevadas, o que limita a capacidade do músculo de desenvolver tensão ativa (Kern et al., 2002).

As alterações musculares decorrentes da desnervação estão relacionadas à diminuição da atividade do músculo e à morosidade para restauração da função motora (Dow et al., 2004; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

Apesar da capacidade do sistema nervoso periférico de regenerar seus axônios, a recuperação funcional e morfológica são frequentemente pobres,

sendo raramente completa e perfeita, apesar da utilização de técnicas modernas de reconstrução, pois inúmeros fatores influenciam na regeneração da fibra nervosa, principalmente na neurotmeose (Gordon, Sulaiman e Boyd, 2003; Monte-Raso et al., 2006; Chen, Yu e Strickland, 2007).

A regeneração nervosa pode ser lenta devido alguns fatores que dificultam o reparo motor após a desnervação, dentre eles: 1- o broto pode não crescer ao longo do tubo endoneural do nervo distal devido à colagenização desses tubos e fragmentação da lâmina basal das células de Schwann; 2- o músculo se torna menos receptivo aos axônios motores devido à perda de fibras musculares, fibrose e exaustão das células satélites (Bain et al., 2001, Ferreira, 2001). Monte-Raso et al. (2006) relatam que a natureza e o nível da lesão, o tempo de desnervação, o tipo e o diâmetro das fibras nervosas afetadas, a idade do indivíduo e outras variáveis individuais também são responsáveis pelo sucesso da regeneração.

Entretanto, já está estabelecido na literatura o tempo de regeneração nervosa após esmagamento. Mira (1979) observou que após esmagamento do nervo isquiático de ratos, fibras nervosas regeneradas estão presentes no nervo distal em torno do 10º ao 15º dia, com retorno da normalidade no 2º mês, porém a variação nos diâmetros das fibras permaneceu mesmo depois de dois anos da lesão.

O estudo de Gorio et al. (1983) corrobora estes resultados, apontando que 25% das fibras musculares já estão poli-inervadas em aproximadamente 15 dias após o esmagamento do nervo isquiático em ratos, e aos 25 dias, o pico de poliinervação é atingido e a atividade mecânica do músculo está parcialmente recuperada. Por volta do 26º ao 60º dia, os contatos sinápticos excessivos são

eliminados e a fibra muscular torna-se mono-inervada e, em 90 dias, o tamanho das junções neuromusculares regeneradas já está quase recuperado, ocupando quase que completamente a fenda pós-sináptica.

Considerando a necessidade de minimizar as limitações impostas pela desnervação no sistema neuromuscular, diversos recursos podem ser aplicados para acelerar o processo de recuperação funcional.

2.5 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Diversos estudos experimentais têm investigado a influência da estimulação elétrica sobre a regeneração de fibras nervosas (Tam et al., 2001; Love, Son e Thompson, 2003; Cheng e Lin, 2004).

A estimulação elétrica é um recurso aplicado através de pulsos elétricos, que geram potenciais de ação e estimulam músculos, nervos periféricos e demais tecidos, proporcionando uma gama de benefícios terapêuticos (Sheffler e Chae, 2007).

A efetividade da estimulação elétrica depende dos parâmetros de estímulo e do padrão da estimulação, dentre os quais estão a amplitude, a duração do estímulo, a frequência de pulso, a duração dos trens de pulso e o intervalo entre eles. Entretanto, há controvérsias a respeito do padrão mais adequado a ser utilizado a fim de reverter os efeitos deletérios da desnervação (Eberstein e Eberstein, 1996).

Estudo prévio aborda a importância de se considerar as variáveis relacionadas à utilização deste tipo de tratamento, entre elas o tempo de estimulação ou o número de contrações que o músculo sofre durante uma sessão de tratamento (Dow et al., 2004). Os autores relatam que o número de contrações

parece ser determinante na manutenção das propriedades do músculo desnervado, mostrando que um número pequeno de contrações diárias não é suficiente para minimizar a atrofia. Por outro lado, apontam que um número excessivo de contrações diárias pode aumentar o dano ao tecido, pelo excesso de energia aplicada durante a estimulação elétrica.

Na prática clínica, a utilização de corrente elétrica é benéfica em casos de desnervação parcial ou total, principalmente por seu efeito no tecido muscular, retardando o processo de atrofia e desacelerando a rápida proliferação de tecido conjuntivo (Decherchi et al., 2003; Fernandes et al., 2005), favorecendo a manutenção das características morfométricas e bioquímicas do músculo desnervado, o que auxilia na recuperação muscular observada no período de reinervação (Carter et al., 1998).

Entretanto, o papel da estimulação elétrica para o brotamento axonal é controverso, havendo relatos de efeitos positivos, facilitando o crescimento de axônios em regeneração, quando aplicada no nervo proximal à lesão (Al-Majed et al., 2000; Brushart et al., 2002; Gordon, Sulaiman e Boyd, 2003) e negativos quando a estimulação elétrica é aplicada no músculo, devido à redução da oferta de fatores tróficos aos axônios em regeneração (Hennig 1987; Lieber, 2002; Love, Son e Thompson, 2003).

Duas formas de aplicação da estimulação elétrica têm sido utilizadas em modelos experimentais: a crônica e fásica.

A eletroestimulação crônica é aplicada por períodos superiores a 8 horas diárias, sendo que em animais experimentais utiliza-se, normalmente, eletrodos e eletroestimuladores implantados. Este tipo de estimulação não é comum na clínica devido ao risco de lesões e infecções, uma vez que envolve

procedimento cirúrgico (Windisch et al., 1998; Dow et al., 2004; Dow, Faulkner e Dennis, 2005).

Os resultados da estimulação elétrica muscular crônica têm se apresentado bastante controversos. Há estudos que utilizam eletroestimulação crônica, seja de baixa ou alta frequência, cujos autores acreditam que ela afete a musculatura de humanos da mesma maneira que a de animais, aumentando a capacidade oxidativa do músculo, o número de capilares e promovendo alteração dos tipos de fibras musculares, além de manter as propriedades contráteis e metabólicas do músculo desnervado, o que favorece o restabelecimento da função motora após a reinervação (Cole e Gardiner, 1984; Pette e Vrbová, 1999; Decherchi et al., 2003; Dow et al, 2004; Dow, Faulkner e Dennis, 2005; Marqueste et al., 2006).

Por outro lado, há evidências de que, quando aplicada diretamente ao músculo, provoca atraso da reinervação (Hening, 1987), provavelmente por interferir na produção de moléculas facilitadoras da reinervação, como a NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), o IGF (Insulin Growth Factor-1), a tenascina, HPG (Heparan-Sulfate Proteoglican) e a glicoproteína glicotransferase. Como essas moléculas são estimuladas quando há diminuição ou ausência de estímulo elétrico e mecânico no músculo, a estimulação elétrica muscular crônica pode diminuir a expressão dessas moléculas, diminuindo, portanto, a capacidade de reparo nervoso e conseqüente reinervação muscular (Gorio et al., 1983; Engel e Franzini-Armstrong, 1994; Lieber, 2002).

Tam et al. (2001) observaram que a atividade neuromuscular intensa, por meio do exercício de corrida em roda ou eletroestimulação crônica contínua (F=20Hz) durante 8 horas diárias, causam efeito deletério sobre a unidade motora

e diminuição do número de brotos nodais e terminais, sendo o número de terminações inervadas por axônios regenerados reduzido de 41% para 5% após uma extensa desnervação. Eles justificam que a atividade neuromuscular e o aumento da concentração de cálcio pela estimulação podem inibir a liberação de fatores de crescimento neural.

Love, Son e Thompson (2003), mostraram resultados semelhantes em estudo com os músculos sóleo e gastrocnêmio parcialmente desnervados e submetidos à eletroestimulação crônica, onde houve diminuição do brotamento axonal por inibição da formação de pontes entre os processos de células de Schwann entre junções neuromusculares inervadas e desnervadas.

Para Eberstein e Eberstein (1996), a estimulação de músculos desnervados não impede efetivamente a regeneração axonal. No entanto, os benefícios da eletroestimulação são observados apenas quando um padrão apropriado de estímulo for aplicado, ou seja, quando o padrão de estimulação for semelhante ao do motoneurônio normal (Nix e Hopf, 1983; Eberstein e Eberstein, 1996).

Dos estudos que avaliaram a estimulação elétrica crônica de baixa frequência sobre o processo de regeneração nervosa, a maior parte se refere ao nervo proximal à lesão e aponta respostas benéficas sobre a regeneração nervosa (Nix e Hopf, 1983; Brushart et al., 2002).

Nix e Hopf (1983) evidenciaram aumento da velocidade de regeneração nervosa após axoniotmese em nervo isquiático de coelhos, seguido de eletroestimulação crônica durante 24 horas, por 4 semanas. Na segunda semana após a lesão a recuperação funcional foi melhor que no grupo somente

desnervado. Eles sugeriram que a estimulação nervosa periférica induz ativação central e periférica, resultando em aumento da regeneração.

Gordon, Sulaiman e Boyd (2003) verificaram o efeito da estimulação elétrica sobre o tempo de regeneração axonal após secção do nervo femoral em ratos, seguida de neurografia e estimulação contínua do nervo proximal durante duas semanas. Observaram que a eletroestimulação (20Hz) aplicada 24 horas/dia acelerou a regeneração de axônios motores, havendo reinervação motora após três semanas, o que na ausência de estímulos elétricos ocorre preferencialmente após oito semanas. Como este protocolo era inviável para a clínica, diminuíram o período de estimulação para uma hora ao dia, observando aceleração no crescimento de axônios através do local da reconexão.

O estudo citado anteriormente baseou-se no experimento de Al-Majed et al. (2000), que utilizou o mesmo protocolo de estimulação, fato que permitiu determinar que o período de regeneração axonal e a PMR (*preferential motor reinnervation*) podem ser acelerados pela estimulação elétrica do nervo proximal à axoniotmese. Após três semanas, observaram motoneurônios projetados para o músculo e para o tecido cutâneo, o que normalmente se observa em oito semanas após a neurografia. Os autores atribuíram esse fato ao aumento da expressão de TrKb (Tirosine Kinase B), uma substância trófica presente no processo de regeneração, cuja ação parece estar ligada à proliferação de células de Schwann.

Brushart et al. (2002) analisaram dois mecanismos para reduzir a regeneração axonal “desordenada” usando a eletroestimulação contínua de 20 Hz, 1hora/dia no nervo proximal à lesão: 1. sincronismo do crescimento através da sutura do nervo femoral de ratos e 2. aumento da velocidade da regeneração

do axônio motor em direção ao segmento distal do nervo. Verificaram que, embora muitos axônios tivessem atravessado o local da sutura entre a terceira e quarta semana, a estimulação elétrica aumentou a passagem dos brotos axonais entre o 4° e 7° dia, sendo que apenas alguns brotos atravessaram após duas semanas. Concluíram que, a estimulação promove o início da regeneração do axônio motor, sem no entanto aumentar esta velocidade .

Em 2005, Brushart et al. realizaram secção do nervo femoral de ratos, utilizando o mesmo protocolo de estimulação elétrica. Observaram que uma média de 40% dos neurônios motores reinervaram o músculo sem estimulação e, com a estimulação, 75% dos axônios retornaram ao tecido de origem.

Outro tipo de estimulação elétrica utilizada após desnervação é a estimulação elétrica fásica de baixa freqüência, caracterizada por um período de intervenção que não ultrapassa 20 a 30 minutos (Kern et al., 2002; Fernandes et al., 2005; Rocha, 2006).

Considerando que esta é a modalidade utilizada na clínica, estudos apontam seus resultados positivos em relação à excitabilidade e condições metabólicas do músculo (Silva et al., 1999), favorecendo o remodelamento do tecido conjuntivo, minimizando a atrofia (Kanaya e Tajima, 1992; Fernandes et al., 2005) e diminuindo os níveis de mRNA da atrogina -1 e myoD (Russo et al., 2007), possibilitando melhor recuperação funcional após reinervação.

Polacow et al. (2003), utilizando estimulação fásica de baixa freqüência (pulsos quadrados bifásicos, $f= 10\text{Hz}$, $T= 3\text{ms}$, $i= 5\text{mA}$, *on/off* de 2:2, 20 min/dia) associada a metformina durante 15 dias em músculo sóleo desnervado de ratos, observaram redução na densidade de área de tecido conjuntivo e aumento na quantidade de grânulos de glicogênio. Tais resultados sugerem uma melhora das

condições metabólicas das fibras.

Fernandes et al. (2005) e Rocha (2006), após esmagamento do nervo isquiático e estimulação fásica do músculo sóleo de ratos (30 min/dia, durante 20 dias), seguindo os mesmos parâmetros definidos por Polacow et al. (2003), observaram que a estimulação aplicada foi suficiente para minimizar a atrofia e a proliferação de tecido conjuntivo no músculo desnervado.

Russo et al. (2007) aplicaram estimulação fásica no músculo tibial anterior de ratos desnervados ($f = 20\text{Hz}$, $on/off = 3:6$, 20 contrações/sessão a cada 48h, durante 28 dias) e verificaram que os níveis de mRNA da atrogina-1 e da myoD, genes relacionados à degradação protéica e miogênese, respectivamente, reduziram significativamente no grupo eletroestimulado.

Apesar dos benefícios da estimulação elétrica fásica sobre os músculos desnervados, poucos estudos encontram-se disponíveis na literatura utilizando modelos experimentais e análise da influência deste tipo de corrente sobre a regeneração nervosa.

Sebille e Bondoux-Jahan (1980) analisaram os efeitos da estimulação muscular fásica aplicada durante 30 minutos diários, no curso da reinervação e crescimento axonal após axotomia por congelamento do nervo fibular comum de ratos e observaram aceleração da taxa de recuperação da função motora.

Cheng e Lin (2004) estudaram diferentes protocolos de estimulação elétrica muscular (30 min/dia, durante 3 semanas) sobre a regeneração de nervos seccionados e reparados com tubos de silicone. Houve diminuição da área da fibra nervosa sem afetar o número de fibras mielinizadas e aumento da densidade da fibra nervosa e do número de axônios.

Considerando a frequência de utilização da estimulação elétrica na clínica, estudos que comprovem seus benefícios para o nervo são necessários.

Outra forma de acelerar o processo de regeneração e reparação do tecido nervoso é através do exercício físico, dentre eles o exercício de natação.

2.6 EXERCÍCIO FÍSICO E REGENERAÇÃO NERVOSA

Recentemente, diversas pesquisas têm evidenciado que a atividade física em geral mantém a homeostase do organismo, a integridade cérebro-vascular, a função cardiorrespiratória, aumenta as conexões dendríticas e a eficiência de processamento de funções no sistema nervoso central (Jones e Carter, 2000; Meek et al., 2004; Molteni et al., 2004; Radak et al., 2006).

No sistema musculoesquelético, a prática de exercícios tem estimulado significativas mudanças histológicas, bioquímicas e funcionais, proporcionando maior eficiência muscular devido à hipertrofia, aumento da vascularização pelo aumento dos capilares sanguíneos, ganho de peso muscular e aumento do fornecimento de energia, devido ao aumento do número e tamanho das mitocôndrias (Herbison e Gordon, 1973; Nakao et al., 2000; Possebon et al., 2001; Sakakima et al., 2004; Ciabattari, Dal Pai e Dal Pai, 2005; Tanaka, Tsubaki e Tachino, 2005).

O aumento da atividade contrátil resulta também na melhora do metabolismo do glicogênio, desencadeando aumento da expressão da proteína GLUT4, um transportador de glicose responsável pela homeostasia glicêmica da fibra muscular, que resulta em elevação da sensibilidade insulínica de todo o corpo, proporcionando maior captação de glicose (Possebon et al., 2001; Tsai et al., 2006).

A resposta ao exercício depende da duração, intensidade e frequência de realização (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1982; Terada e Tabata, 2004) e está associada à condição do indivíduo no início da atividade, potencial genético e idade (Jones e Carter, 2000).

Do mesmo modo que o aumento da atividade neuromuscular provoca adaptações na célula muscular, a interrupção ou diminuição desta também determina mudanças responsáveis por alteração funcional, como ocorre em casos de desnervação, secção da medula espinhal, imobilização, suspensão do membro, microgravidade e destreinamento (Cardoso, 2004; Deschenes, Tenny e Wilson, 2006).

Diversas formas de atividade física têm sido estudadas experimentalmente para acelerar a recuperação funcional após a lesão nervosa periférica. Entretanto, poucos estudos citam o impacto da atividade física aplicada na fase de desnervação-reinervação do músculo sobre o processo de regeneração nervosa (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; Van Meeteren et al., 1997a; Byun et al., 2005, Seo et al., 2006).

A maioria dos estudos discute os efeitos do exercício na fase de reinervação – aproximadamente duas semanas após a lesão nervosa – afirmando que deve haver um período de repouso antes do exercício (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974, 1980a, 1982; Sarikcioglu e Oguz, 2001; Tam et al., 2001).

Herbison, Jaweed e Ditunno (1974, 1980a) relataram que não havia estudos na literatura apontando a melhor intensidade e o momento ideal para iniciar o exercício após lesão nervosa, entretanto, baseados na hipótese de que o dano muscular pode ocorrer durante o curso da reinervação, quando o número de unidades contráteis é menor ou a intensidade de exercício nesta fase pode ser

mais alta, acreditavam que a fase de reinervação do músculo era a melhor para o início do exercício.

Para comprovar essa hipótese, propuseram um protocolo de exercício para ratos, após lesão bilateral do nervo isquiático, em que dois grupos de ratos iniciavam a natação após três semanas da desnervação, treinando por três semanas, enquanto os outros dois grupos iniciavam após quatro semanas da desnervação, treinando por duas semanas. O benefício foi maior no grupo que iniciou o exercício mais tardiamente. Por esse motivo, concluíram que o exercício precoce inibe o processo de reinervação, por diminuir as propriedades contráteis do músculo (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974).

Estudo desenvolvido por Gutmann e Jakoubek (1963), onde ratos jovens foram submetidos a esmagamento bilateral do nervo isquiático e, 24 horas após, a um programa de treinamento progressivo de natação (3 ou 4x/dia por 60 minutos e intervalos de 90 minutos entre cada sessão) durante 35 dias, mostraram que a natação intensa promoveu retardo no processo de maturação do nervo em regeneração, pois houve diminuição do diâmetro dos axônios e diminuição do conteúdo total de nitrogênio do nervo, porém sem alteração do número de fibras nervosas regeneradas.

Tam et al. (2001) observaram que o aumento da atividade neuromuscular, por meio do exercício de corrida na roda ou eletroestimulação, durante 8 horas diárias, causa efeito deletério sobre a unidade motora e o brotamento após desnervação extensa (onde menos de 20% das unidades motoras remanescentes estavam intactas), mas não em caso de desnervação moderada. Concluíram que, sob condições de atividade fisiológica, como a atividade na caixa, o brotamento axonal fisiológico promove aumento no tamanho

de unidades motoras durante a fase aguda da regeneração, ao passo que a atividade não fisiológica pode ser deletéria.

Sarikcioglu e Oguz (2001) analisaram a influência do exercício de natação aplicado em diferentes períodos da regeneração após esmagamento do nervo isquiático de coelhos treinados e sedentários (10 min/dia, durante 10 dias). O programa de exercício teve início na 2^a, 3^a e 4^a semana de regeneração, em diferentes dias. No grupo treinado da 4^a semana de regeneração, os restos de mielina tinham sido removidos e havia presença de fibras mielinizadas quando comparados ao grupo sedentário no mesmo período. Essa diferença não foi encontrada nos demais grupos de regeneração entre os animais treinados e sedentários.

Esses estudos foram reafirmados por Tam e Gordon (2003) que apontam que após desnervação, a atividade precoce de corrida na roda por 8 horas diárias inibe o brotamento axonal, devido ao comprometimento da formação de pontes perisinápticas de células de Schwann, ocasionadas pela atividade neuromuscular intensa sem, no entanto, inibir a sua proliferação. Porém, sugerem que deve haver atividade de nível moderado (atividade na gaiola), a fim de minimizar os efeitos deletérios da desnervação.

Por outro lado, estes relatos divergem dos achados de Van Meeteren et al. (1997a) que apontam que a atividade física na fase de desnervação aumenta o retorno da função sensório-motora e persiste na fase tardia da reinervação, apontando que o exercício 24 horas após a lesão por esmagamento do nervo isquiático pode ser benéfico para o crescimento axonal, maturação das fibras regeneradas e recuperação das propriedades contráteis do músculo. Para analisar os benefícios da fase tardia, os grupos experimentais foram observados

aos 50, 75, 100, 125 e 150 dias após a cirurgia de esmagamento do nervo isquiático por análise eletrofisiológica. Aos 150 dias, a velocidade de condução do nervo motor era melhor nos grupos exercitados do que no grupo controle.

Marqueste et al. (2004) submeteram ratos à eletroestimulação muscular durante 5 horas/dia, na fase precoce da reinervação e ao exercício em esteira (1,5 hora, 2x/dia, 5 dias/semana, durante 10 semanas). Observaram que a eletroestimulação foi eficiente somente na manutenção do peso muscular, por proporcionar ativação de maior quantidade de fibras musculares e que o protocolo de exercício proposto foi capaz de aumentar a resistência à fadiga, restaurar as propriedades contráteis e a mecanosensibilidade do músculo, devido ao aumento na liberação de fatores neurotróficos (BDNF, NT3 e NT4) após a lesão e aumento na distribuição dos canais de potássio nas fibras regeneradas.

Byun et al. (2005) submeteram ratos a esmagamento do nervo isquiático e, após 72 horas, a exercício em esteira (30 min/dia, por 12 dias consecutivos). O exercício foi efetivo na recuperação funcional, aumentando rapidamente os valores do Índice Funcional do Ciático (IFC) a partir do 4º dia, promovendo aumento do desempenho motor pela diminuição exagerada da expressão do BDNF mRNA.

Seo et al. (2006) apontaram resultados semelhantes em seu estudo em que ratos realizaram o exercício na esteira após 12 h do esmagamento do nervo isquiático (30 min, 2x ao dia, por 14 dias). Eles consideraram que a corrida favoreceu a recuperação sensório-motora e a regeneração axonal, verificada pelos valores do índice funcional mais próximos ao normal, além de regular a expressão da proteína Cdc2, sintetizada pelas células de Schwann.

A maior parte dos estudos que avaliam a influência do exercício físico em ratos utiliza estímulos negativos que visam incentivar os animais a realizar o exercício, como a ameaça de afogamento durante a natação (Gutmann e Jakoubek, 1963) ou o uso de estímulos elétricos durante a corrida em esteiras (Herbison, Jaweed e Dittuno, 1980 a, b; Van Meeteren et al., 1997a). Entretanto, essa prática pode causar estresse nos animais.

A atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) está diretamente ligada à resposta fisiológica do organismo ao estresse. Considerando que o eixo HHA libera hormônios adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, altas concentrações séricas destes hormônios são consideradas importantes indicadores de estresse (Amako e Nemoto, 1998).

A elevação da concentração de glicocorticóides e cortisol na circulação atua de maneira imunossupressora, diminuindo toda a cadeia imune inflamatória, e conseqüentemente a ação de macrófagos e mastócitos, podendo ocasionar perda da homeostase e efeitos indesejáveis ao organismo (Amako e Nemoto, 1998; Oliveira et. al., 2004; Byun et al., 2005). Isso se torna prejudicial à regeneração nervosa, por refletir na qualidade da recuperação funcional motora após a lesão (Van Meeteren et al., 1997b; Amako e Nemoto, 1998).

Outra variável que pode desencadear esse mecanismo de estresse é a intensidade do exercício, que varia entre as diferentes modalidades, sendo determinada no exercício de natação pela adição de cargas progressivas em relação ao peso corporal, impostas na cauda ou no tórax do rato durante o exercício, enquanto na esteira é determinada pela velocidade (Gobatto et al., 2001; Manchado et al., 2006).

Van Meeteren et al. (1998), realizaram dois experimentos separados com ratos após esmagamento do nervo isquiático. No primeiro, os animais nadaram 180 min/dia, por sete dias previamente à lesão ou por 14 dias consecutivos após a lesão. No segundo, os animais foram exercitados em esteira logo após o esmagamento (30 minutos, 2 vezes ao dia, na velocidade de 10m/min) durante 21 dias. A recuperação funcional sensório-motora dos animais submetidos à natação não foi afetada pelo exercício, porém os animais que fizeram esteira tiveram sua recuperação funcional retardada em consequência da severidade do treinamento ou devido ao estresse causado pelo exercício intenso.

Uma vez que a atividade do eixo HHA mostra relação direta com a intensidade do exercício, na clínica há necessidade de cautela na prescrição de exercício físico a fim de evitar intercorrências durante sua realização, visto que pequenas alterações na intensidade de esforço, especialmente acima da transição metabólica aeróbia/anaeróbia, podem influenciar as respostas fisiológicas específicas do exercício (Manchado et al., 2006). Para a determinação precisa da carga de esforço de acordo com os objetivos pretendidos, os programas de tratamento devem ser baseados em testes que detectem o limiar de anaerobiose (Voltarelli, Mello e Gobatto, 2004).

O limiar de anaerobiose pode ser definido como a intensidade do exercício sobre o qual a produção de energia pelo mecanismo aeróbio é suplementada pelo mecanismo anaeróbio, fornecendo importantes informações acerca dos principais sistemas fisiológicos envolvidos na realização do exercício físico (Wasserman et al., 1999).

A concentração de lactato sérico aumenta exponencialmente com a intensidade do exercício e varia de acordo com o tipo de exercício (Voltarelli, Gobatto e Mello, 2002).

A produção de lactato em excesso pode provocar inibição da via glicolítica, diminuindo o desempenho e contribuindo para fadiga. Além disso, o lactato pode prejudicar as propriedades de contratilidade muscular, por interferir na condutibilidade elétrica da membrana e na atividade metabólica, modificando variáveis fisiológicas e bioquímicas, além de provocar alterações cardiovasculares, respiratórias e endócrinas (Jones e Carter, 2000).

Diante desses fatores, um estudo foi proposto por Gobatto et al. (2001) onde ratos treinados e sedentários foram submetidos a exercício de natação para determinar a Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL). As sessões de natação duravam 20 minutos e os animais suportavam carga de 5 a 10% do peso corporal, durante seis semanas. O lactato sanguíneo foi medido em repouso e a cada cinco minutos do exercício. Verificaram que os ratos sedentários apresentavam MFEL de 5,5 mmol/L de lactato com sobrecarga de 5 e 6% do peso corporal e os treinados mantiveram este lactato com sobrecarga de 8% do peso, assim como os dois grupos submetidos ao exercício sem carga mostraram aumento no lactato inicialmente, seguido de diminuição. Partindo deste resultado, os autores submeteram os animais a treinamento prolongado com carga de 8% do peso, durante 60 minutos e constataram que a MFEL não se alterou.

Apesar de alguns estudos relatarem o fluxo de lactato durante o exercício de natação (Gobatto et al., 2001, Manchado et al., 2006), não se encontra dados disponíveis na literatura determinando a intensidade de exercício para ratos desnervados.

2.7 PERSPECTIVAS DE RECUPERAÇÃO FUNCIONAL

A recuperação das lesões nervosas periféricas, em modelos experimentais, é estudada por meio de técnicas de eletrofisiologia, histomorfometria e testes funcionais. Embora, os parâmetros morfológicos e eletrofisiológicos sejam úteis, nem sempre encontra-se correlação entre eles, por isso se faz necessária avaliação funcional do grau de recuperação (Hare et al., 1992; Munro et al., 1998; Wolthers et al., 2005; Monte-Raso et al., 2006).

As avaliações funcionais são facilmente realizadas em humanos, porém de difícil aplicação em animais, o que motivou diversos pesquisadores a buscar por técnicas de avaliação funcional em estudos experimentais (Hare et al., 1992; Varejão et al., 2004; Monte-Raso, Barbieri e Mazzer, 2006).

Gutmann (1942) citado por De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982), observou que a inabilidade de coelhos para “abduzir os dedos” durante a marcha após lesão de nervo fibular poderia ser um parâmetro seguro para determinar o grau de lesão e recuperação. Todavia seu método não permitia quantificação dessa disfunção.

O método quantitativo conhecido como Índice Funcional do Ciático (IFC), proposto por De Medinaceli, Freed e Wyatt, em 1982, permite a avaliação funcional da marcha, de forma não invasiva, e do grau de recuperação das lesões nervosas. Este método baseia-se em mensurações das impressões das patas posteriores de ratos submetidos à lesão, obtidos durante caminhada num corredor sob películas radiográficas. Quatro parâmetros são mensurados dos lados normal e experimental, que permitem estabelecer o IFC por meio de uma equação, dentre eles: O “TOF” distância de uma pata a outra que corresponde ao comprimento da passada, o “PL” distância entre o 3º dedo e o calcâneo,

corresponde ao comprimento da pata, o “TS” distância do 1° ao 5° dedo que corresponde à largura da pegada ou espalhar total dos dedos e “ITS” distância do 2° ao 4° dedo, que corresponde à largura intermediária da pegada ou espalhar dos dedos intermediários. Este método tornou-se reproduzível e confiável, mostrando correlação com métodos convencionais.

Posteriormente, Carlton e Goldberg (1986) propuseram avaliação dos Índices Funcionais do Fibular (IFF), do Tibial (IFT) e do Ciático (IFC). Bain, Mackinnon e Hunter (1989) baseados em análise de regressão linear múltipla, modificaram as fórmulas e aprimoraram as variáveis medidas nas impressões das patas dos ratos que determinavam os IFC, IFF e IFT. Os parâmetros utilizados para o cálculo foi PL, TS e ITS, excluindo a variável TOF, por induzir os diversos erros e assim diminuir a sensibilidade do índice.

Deste modo, a análise funcional da marcha tornou-se um teste bastante utilizado para avaliar a função nervosa em ratos, considerando que esta requer uma reinervação das unidades motoras complexas pelo *feedback* sensorial integrado corticalmente (Kanaya, Firrell e Breidenbach, 1996; Varejão et al., 2001).

Estudos posteriores demonstraram que a correlação entre funcionalidade e regeneração morfológica do nervo periférico é bastante controversa. Alguns autores relatam não haver correlação dos métodos de avaliação histomorfométricos com o retorno da função sensório-motora (Munro et al., 1998; Varejão et al., 2004; Wolthers et al., 2005). Uma hipótese que pode explicar este fato é que o período de mielinização ocorre antes do axônio alcançar o órgão alvo, portanto este parâmetro não pode relatar recuperação da função (Dash et al., 1996; Kanaya, Firrell e Breidenbach, 1996). Entretanto, há estudos

que demonstram estreita correlação entre a funcionalidade e a regeneração morfológica do nervo isquiático de ratos (Oliveira et al., 2001; Mendonça, Barbieri e Mazzer, 2003; Monte-Raso et al., 2006).

Com base nas alterações morfológicas e fisiológicas, as lesões do Tipo I (neuropraxia) e do Tipo II (axoniotmese) são totalmente reversíveis, onde a recuperação funcional ocorre rápida ou lentamente por desbloqueio da condução nervosa ou por regeneração axonal, respectivamente (Burnett e Zager, 2004).

No entanto, na neurotmese há necessidade de reparo cirúrgico do nervo. Normalmente há presença de tecido cicatricial interposto, retração dos cotos nervosos, necessidade de enxertos, tensão na região da sutura e perda da direção dos axônios, além da possibilidade de entrada de substâncias deletérias no sítio da lesão, o que leva a um prognóstico menos favorável (Ansselin, Fink e Davey, 1997; Gordon, Sulaiman e Boyd, 2003).

De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982) observaram que a recuperação do nervo isquiático após secção e reparo parece nunca ser completa, mesmo após um ou dois anos. No entanto, após esmagamento, esta ocorre entre 16 e 25 dias.

Em 1996, Dash et al. analisaram histológica e funcionalmente a lesão por esmagamento, realizada durante 5 segundos no nervo isquiático de ratos. A recuperação funcional atingiu os níveis controle em três semanas, porém, em análise histológica, a melhora foi observada somente após este período.

Entretanto, apesar da capacidade de recuperação funcional, o ritmo de regeneração varia entre as espécies, sendo que em ratos o crescimento axonal ao longo do tronco nervoso é de 3-4 mm ao dia após esmagamento e de 2,5 mm após secção (Gorio et al., 1983; Stoll e Müller, 1999) e em humanos, de 1mm ao dia após esmagamento (Grant, Goodkin e Kliot, 1999).

Nesse sentido, a associação dos métodos de análise é fundamental, pois quantifica os resultados de diferentes protocolos de tratamento que visam acelerar o processo de regeneração nervosa.

3 OBJETIVO

Avaliar a influência de um protocolo de eletroestimulação muscular fásica de baixa frequência, do exercício de natação livre, bem como da associação entre ambos, sobre as características morfológicas e funcionais do nervo isquiático regenerado após axoniotmese.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Federal de São Carlos (protocolo 027/2006).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 36 ratos *Wistar* machos, com idade entre 6 e 7 semanas e peso médio de 222,05 ($\pm 42,2$ g), mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Metodista de Piracicaba (FACIS - UNIMEP).

Durante o experimento, os animais permaneceram em gaiolas individuais de polietileno, com ração (Purina para roedores) e água “*ad libitum*”, ciclo fotoperiódico de 12 horas claro e 12 horas escuro, sob temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram subdivididos aleatoriamente em 6 grupos (n=6):

Grupo Controle (C): Os animais deste grupo foram mantidos na gaiola durante 22 dias, sem qualquer intervenção.

Grupo Desnervado (D): Os animais foram submetidos à lesão por esmagamento do nervo isquiático e mantidos nas gaiolas por 22 dias.

Grupo Desnervado + Eletroestimulação (DE): Os animais foram submetidos à lesão por esmagamento do nervo isquiático e à Eletroestimulação (EE) após 24 horas da lesão, diariamente, respeitando-se os finais de semana, até completar 22 dias.

Grupo Desnervado + Natação (DN): Os animais foram submetidos à lesão por esmagamento do nervo isquiático e a Natação Livre (NL) após 24 horas da lesão, diariamente, respeitando-se os finais de semana, até completar 22 dias.

Grupo Desnervado + Natação + Eletroestimulação (DNE): Os animais foram submetidos à lesão por esmagamento do nervo isquiático, seguido de Natação livre (NL) e Eletroestimulação (EE) iniciado 24 horas após a lesão, diariamente, respeitando-se os finais de semana, até completar 22 dias.

Ao final do experimento foi realizada a coleta do nervo isquiático e, em seguida, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Índice Funcional do Ciático (IFC)

Para o registro do Índice Funcional do Ciático (IFC), os animais foram previamente treinados a caminhar no dispositivo utilizado para análise, sendo posteriormente coletadas as impressões das patas posteriores de cada animal (De Medinaceli, Freed e Wyatt, 1982).

Para obter as impressões das pegadas, a face plantar das patas posteriores normal e experimental foi pintada com tinta preta de impressão digital e, em seguida, os animais foram colocados para caminhar na passarela de marcha com dimensões de 42 × 8,2 cm, revestida por tiras de papel sulfite A4 branco. Essa passarela termina numa caixa em uma de suas extremidades, com fraca luminosidade em seu interior, onde o animal procurava se abrigar após o percurso, deixando suas pegadas impressas (De Medinaceli, Freed e Wyatt, 1982; Strasberg et al., 1996; Varejão et al., 2004), como mostra a figura 1.



Figura 1 - Passarela de marcha mostrando o registro das pegadas.

O registro das impressões plantares no período pré-operatório foi realizado previamente à lesão nervosa e utilizado como parâmetro inicial para comparação e avaliação dos registros pós-operatórios (PO) obtidos no 7°, 14° e 21° dias.

4.3.2 Protocolo de Esmagamento do Nervo Isquiático

Os animais foram pesados e posteriormente anestesiados com injeção intramuscular de uma mistura de Ketalar[®] (Cloridrato de Cetamina) 50mg/mL e Rompun[®] (Cloridrato de Xilazina) 2g/100mL, na proporção de 1:1 e dose de 0,3mL/100g de peso corporal, conforme estudo piloto realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Plasticidade Neuromuscular da UNIMEP.

Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à tricotomia manual e assepsia da região glútea esquerda, sendo realizada uma incisão cirúrgica de aproximadamente 2 cm sobre a pele,

acompanhando o trajeto da projeção do nervo isquiático sobre a superfície. Após a incisão, os planos musculares foram afastados até a visualização, exposição e acesso ao nervo, sendo realizado o esmagamento nervoso utilizando-se de uma pinça hemostática Erwin-Guth[®] de 12 cm, com as extremidades envolvidas por micropore, a fim de evitar o rompimento das bainhas conjuntivas do nervo (Figura 2 A e B).

O esmagamento do nervo isquiático esquerdo foi realizado por meio de quatro pinçamentos, com duração de 20 segundos e intervalo de um segundo entre eles (Fernandes et al., 2005), como mostra a figura 2 B, sendo a pressão de pinçamento padronizada para todos os animais, utilizando-se como referência o terceiro dente da pinça.

Após o esmagamento nervoso, a estrutura do nervo era observada em microscópio cirúrgico (D.F. VASCONCELLOS[®] – modelo 22654), evidenciando-se uma “transparência” no local do esmagamento nervoso, com preservação dos envoltórios conjuntivos, o que caracteriza uma lesão nervosa do tipo axoniotmese (Figura 2 C).

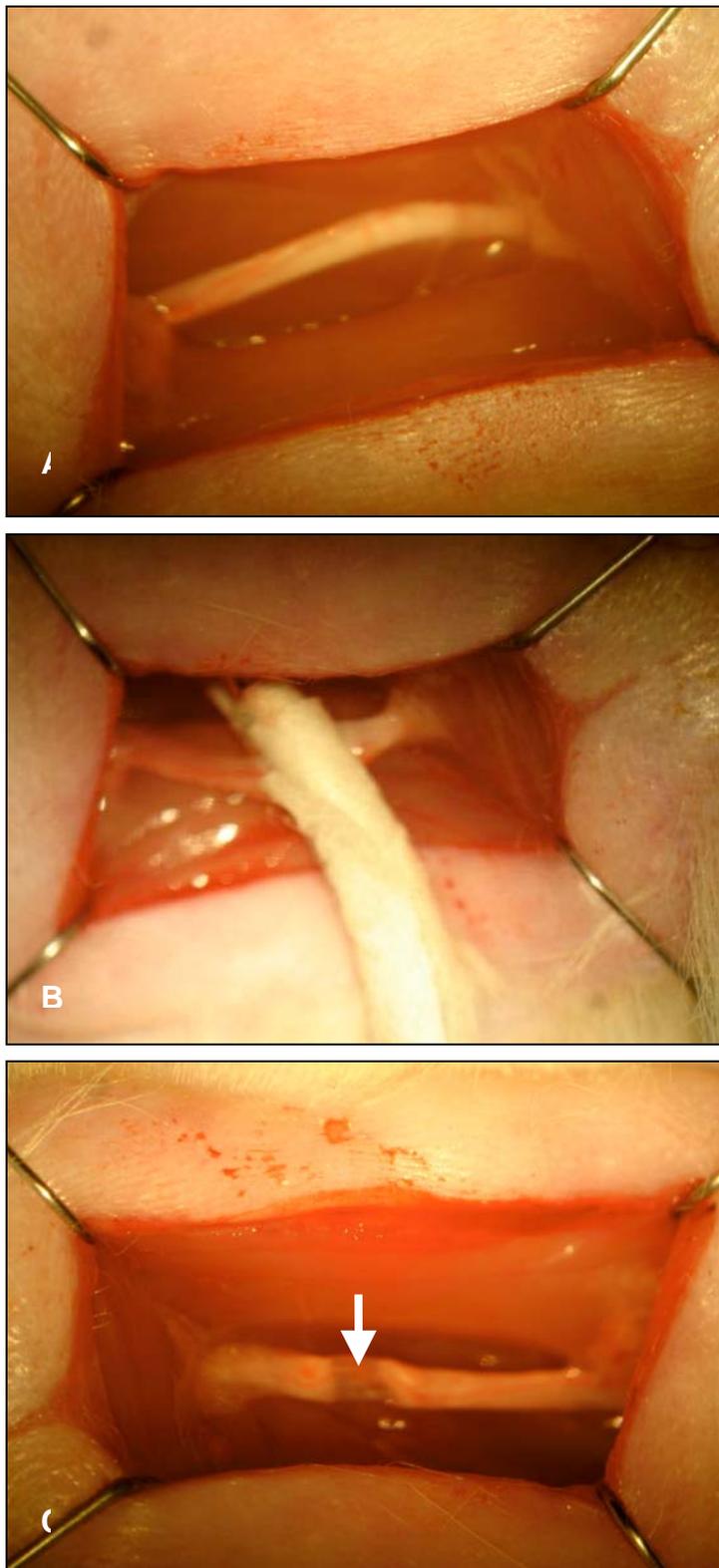


Figura 2 - Nervo isquiático íntegro (A), Esmagamento do nervo isquiático (B), aspecto macroscópico do nervo esmagado (C).

Em seguida, os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio de algodão 6-0 ETHICON. No primeiro e segundo dia pós-operatório administrou-se

4 μ L de analgésico (Dipirona Sódica - 500 mg/mL), por via oral e PVP (Povidine) – I 10% sobre o local da incisão, a cada 12 horas.

4.3.3 Protocolo de Estimulação Elétrica (EE)

Após 24 horas do esmagamento nervoso, os animais dos grupos DE e DNE foram previamente anestesiados com uma mistura de Ketalar[®] (Cloridrato de Ketamina) 50mg/mL e Rompun[®] (Cloridrato de Tiazina) 2g/100mL, na proporção de 1:1, na dose de 0,15 mL/100g de peso corporal e, em seguida, posicionados em decúbito dorsal para realização do protocolo de eletroestimulação no músculo sóleo esquerdo.

As regiões inguinal e posterior da pata esquerda foram tricotomizadas e dois eletrodos percutâneos auto-adesivos (VALUTRODE[®]) com 1 cm² de área foram acoplados: um sobre o músculo sóleo e outro na região inguinal (Figura 3), utilizando-se gel como meio de contato entre a pele e eletrodo.



Figura 3 - Posicionamento dos eletrodos auto-adesivos (seta azul = região inguinal; seta vermelha = região posterior da pata).

Os animais foram eletroestimulados diariamente, 30 minutos ao dia, 5 vezes por semana, durante 22 dias, respeitando os finais de semana e mantendo

intervalo de 24 horas a cada estimulação, realizado sempre no período vespertino, totalizando 14 sessões de EE.

A corrente elétrica foi gerada pelo equipamento DUALPEX 961[®] (QUARK, Brasil) (Figura 4) com os seguintes parâmetros: forma de pulso quadrada bifásica simétrica, tempo de duração do pulso de 3ms, frequência de 10 Hz e intensidade de 5 mA, padronizada a partir da visualização de contração vigorosa do músculo sóleo, caracterizada pelo movimento de flexão plantar, sendo acrescida de 1 mA a cada 5 minutos, a fim de evitar acomodação do estímulo, e com duração de 30 minutos.



Figura 4 - Aparelho DUALPEX 961[®] utilizado para eletroestimulação.

4.3.4 Protocolo de Natação Livre (NL)

Os animais dos grupos DN e DNE passaram por um período de adaptação à água antes de iniciar o experimento. O protocolo de adaptação consistiu em colocar os animais num tanque circular (JAPT[®]) com profundidade de 60 cm e capacidade para 500 litros, adaptado para ratos (Figura 5), contendo água em profundidade de 30 cm (Gobatto et al., 2001), sem carga e com a

temperatura mantida a $31 \pm 2^\circ\text{C}$, por meio de um aquecedor acoplado ao próprio tanque e por um aquecedor de aquário ligado a um termostato (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; Harri e Kuusela, 1986; Carvalho, 2001). A adaptação iniciou com 20 minutos de exercício no primeiro dia, havendo acréscimo progressivo de 10 minutos diários, atingindo 60 minutos no quinto dia (Voltarelli, Gobatto e Mello, 2002).



Figura 5 - Tanque com aquecedor utilizado para a adaptação e exercício dos animais.

Após 24 horas da lesão nervosa e o período de condicionamento, os animais foram submetidos à natação diária, em grupos de no máximo 6 animais, utilizando-se apenas do próprio peso corporal (Figura 6 A e B), por um período de 14 dias, 30 minutos ao dia, 5 vezes por semana, durante 22 dias, respeitando-se os finais de semana e mantendo intervalo de 24 horas a cada sessão de exercício, realizado sempre no período matutino.

A temperatura foi a mesma utilizada para adaptação e o nível da água foi mantido em torno de 40 cm de profundidade, a fim de evitar que o animal se apoiasse no fundo e nas bordas do tanque.

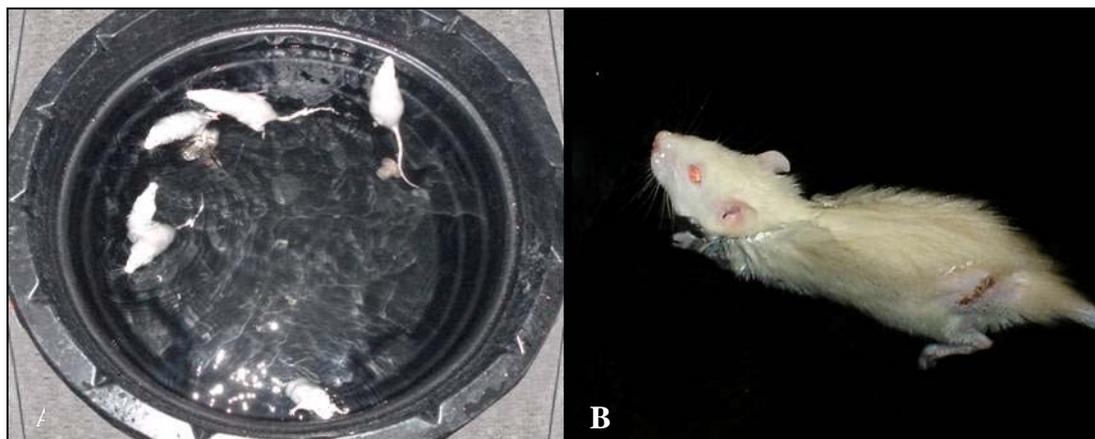


Figura 6 - Animais no tanque durante a natação (A) e Destaque durante o exercício (B).

Os animais foram colocados na água e estimulados durante todo tempo para evitar o uso de artifícios, como ficar parado ou se apoiar na borda do tanque para descansar, pois estes tendem a nadar energicamente por 5 - 10 minutos e, em seguida, permanecem em posição de flutuação, mantendo-se imóveis e com a cabeça fora da água (Van Meeteren et al., 1997a). Esse estímulo era realizado por meio de toques delicados nos animais, com um bastão de madeira, tomando-se o cuidado de evitar o estresse, visto que a ameaça de afogamento induz ao estresse e pode causar alterações fisiológicas, comportamentais e psicológicas negativas na recuperação funcional após lesão (Gutmann e Jakoubek, 1963; Van Meeteren et al., 1997a).

Após cada sessão de exercício, os animais eram secados com toalhas de pano, escova e jato de ar quente, produzido por um secador (TAIFF RS-3[®]). Em seguida, eram realocados nas respectivas gaiolas.

4.3.5 Coleta e Processamento do Nervo Isquiático

Após o período de 6 ou 22 dias de sobrevida estipulado para cada grupo, os animais foram novamente pesados e anestesiados, da mesma forma que para o procedimento de lesão nervosa.

O nervo isquiático esquerdo foi exposto cirurgicamente e fixado *in situ* à 4°C, durante 10 minutos, com fixador Karnovsky (1965) modificado, contendo 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.3. O nervo foi seccionado e sua porção distal mantida em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas e pós-fixada em Tetróxido de Ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.3, por duas horas. Posteriormente, foram imersos em uranila 5% durante 24 horas, para coloração em bloco, desidratados em soluções crescentes (30% a 100%) de acetona e incluídos em resina Araldite (UEGAMA®).

Após esse procedimento, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

A seguir foram obtidos cortes transversais de 1µm com a navalha de vidro, em ultramicrotomo LKB, corados com azul de toluidina a 1%, em solução aquosa de bórax a 1%, para microscopia óptica (Reynolds, 1963 citado por Teodori, 2000).

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

4.4.1 Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada em sistema analisador de imagens *Image-Pro Plus 4.5 - Media Cybernetics®*, a fim de obter o número de axônios, a espessura das bainhas de mielina, o diâmetro das fibras e dos axônios e razão G. A calibração do sistema de análise de imagens para a obtenção de medidas na unidade de micrômetros (µm) foi realizada com auxílio de uma lâmina de calibração micrometrada ZEISS 5+ 100/ 100 mm.

Foi analisado um corte histológico por animal em cada grupo, em microscópio óptico (OLYMPUS BX 41- BF), sendo a lâmina histológica focalizada em objetiva de 10X, para a observação de todo o nervo e, de 100X, em imersão, para captação da amostra a ser analisada. A imagem da amostra, que consistiu de 5 campos do nervo, aleatoriamente definidos, foi visualizada *on line* no *display*, normalizada e congelada.

As medidas foram realizadas de forma semi-automática, sendo cada fibra nervosa mielínica e axônio contornados com o mouse para obter os valores (em micrômetros) referentes ao diâmetro da fibra e diâmetro do axônio, respectivamente (Figura 7).

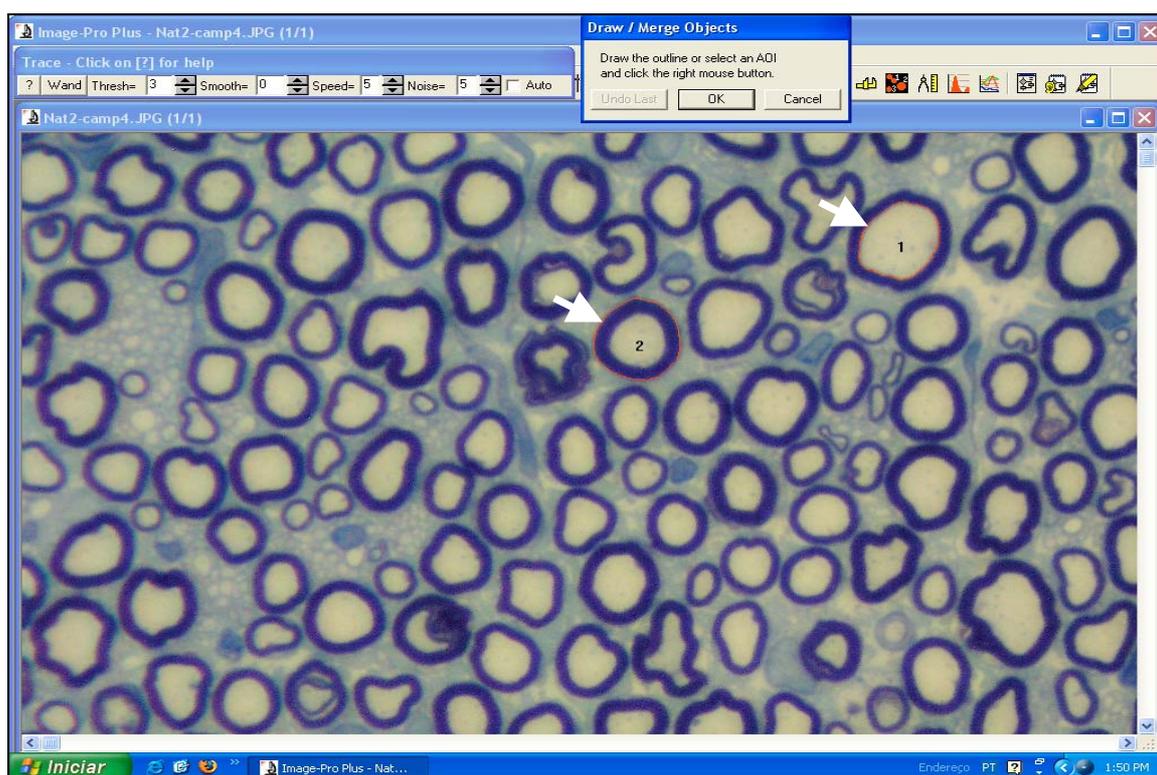


Figura 7 - Procedimento para mensuração do diâmetro do axônio (1) e da fibra nervosa mielínica (2) no software Image-Pró Plus 4.5 (Media Cybernetics®). Aumento = 1000x.

Os valores referentes à medida de cada axônio foram transferidos para o *Excel* e constituíram uma lista de dados.

Considerando que as imagens foram obtidas em câmera de vídeo JVC Modelo TK-C620U e em câmera digital OLYMPUS – C-5050, 5.0 *megapixels*, com resolução de 2560 x 1920 dpi, acoplada a fotomicroscópio OLYMPUS BX 41, foi utilizado um fator de correção para calibração do *software* analisador de imagens.

O fator de correção foi obtido circulando-se os diâmetros internos e externos dos mesmos axônios em imagens obtidas nas duas câmeras, conforme o exemplo abaixo:

Diâmetro externo obtido em imagem da câmera JVC = x μm

Diâmetro externo obtido em imagem da câmera OLYMPUS = y μm

Fator de correção = x μm / y μm = Z

Em seguida, utilizando o programa *Excel*, o fator de correção (z) foi aplicado a cada valor obtido para o número de axônios.

O diâmetro médio dos axônios, diâmetro médio das fibras, espessura média da bainha de mielina e razão G, foram obtidos pelas fórmulas apresentadas a seguir:

Diâmetro médio axônios: $\frac{\sum \text{diâmetro axônios}}{\text{número axônios}}$

Diâmetro médio fibras: $\frac{\sum \text{diâmetro fibras}}{\text{número fibras}}$

Espessura da bainha mielina: $\frac{\text{diâmetro da fibra} - \text{diâmetro do axônio}}{2}$

2

Espessura média da bainha de mielina: $\frac{\sum \text{espessura mielina}}{\text{número mielina}}$

número de fibras

Razão G: $\frac{\text{diâmetro do axônio (média)}}{\text{diâmetro da fibra (média)}}$

4.4.2 Quantificação dos Axônios

O número total de axônios em cada nervo foi calculado a partir da somatória do número de axônios obtidos nos 5 campos, em objetiva de 100X. Para isso, foi estabelecida uma proporção entre este valor e a área total do nervo, obtida em objetiva de 10X. A figura 8 mostra como a área do nervo foi calculada.

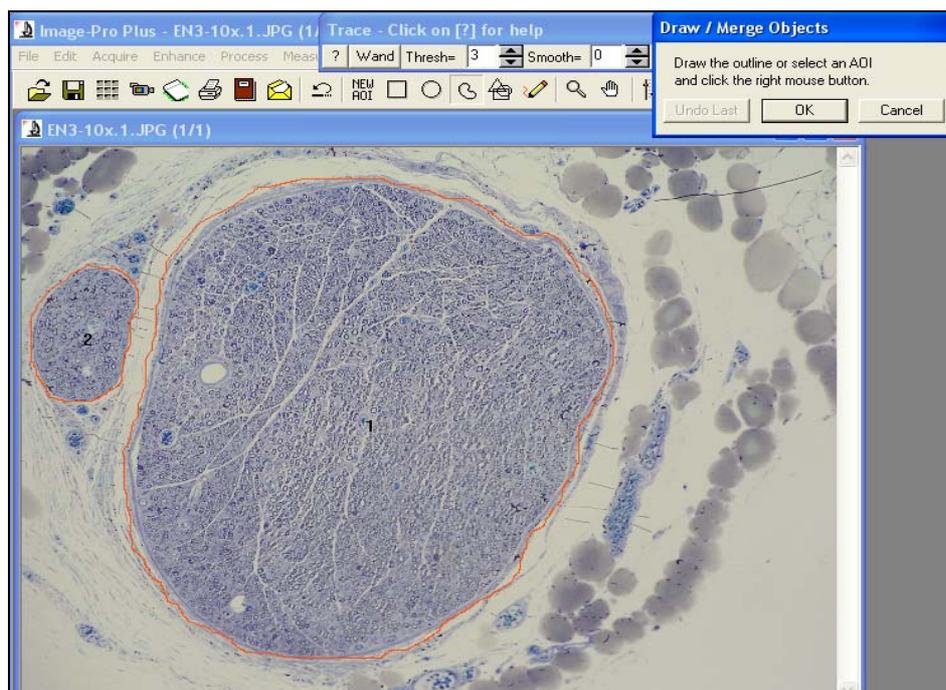


Figura 8 - Mensuração da área do nervo no software Image-Pró Plus 4.0 (Media Cybernetics®). Aumento = 100x.

As fórmulas a seguir demonstram como foram calculados a porcentagem da amostra e o número total de axônios em cada nervo, respectivamente:

% amostra: $\frac{\Sigma \text{ área dos campos} \times 100}{\Sigma \text{ área do nervo}} = 5\%$

$\Sigma \text{ área do nervo}$

Número total de axônios: $\frac{\Sigma \text{ número axônios} \times 100}{\% \text{ amostra}}$

4.4.3 Análise Funcional da Marcha

O cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC) foi obtido utilizando-se um paquímetro digital (MITUTOYO®) para a medida das impressões plantares dos animais nos diferentes grupos e diferentes momentos do experimento. Os parâmetros considerados para esse cálculo foram as medidas: (1) da distância entre a extremidade do terceiro dedo ao calcâneo - Comprimento da Pegada (PL); (2) da distância entre o primeiro e o quinto dedo - Largura da Pegada (TS); (3) da distância entre o segundo e o quarto dedo - Largura Intermediária da Pegada (ITS) (Figura 9):

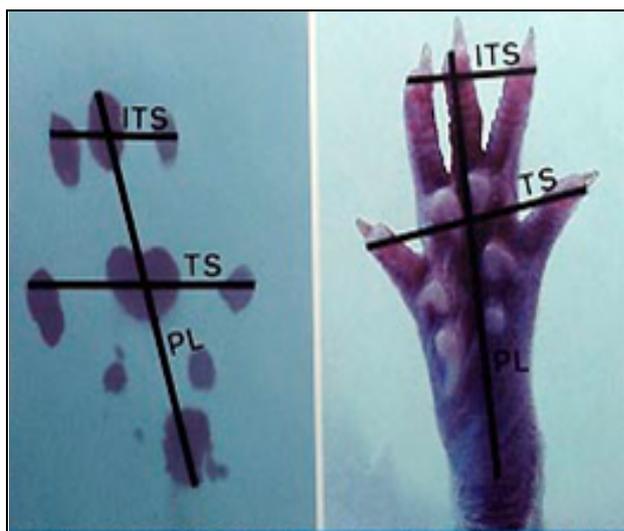


Figura 9 – Parâmetros para mensuração da pata dos animais.
Fonte: Varejão et al., 2004.

As medidas foram realizadas na pata experimental (E) e na pata normal (N) e, em seguida, foram organizadas na seguinte equação que expressa a funcionalidade (Bain, Mackinnon e Hunter, 1989):

$$\text{SFI} = -38,3 \left(\frac{\text{EPL} - \text{NPL}}{\text{NPL}} \right) + 109,5 \left(\frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}} \right) + 13,3 \left(\frac{\text{EIT} - \text{NIT}}{\text{NIT}} \right) - 8,8$$

Por meio desta equação, desenvolvida por De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982) e modificada por Bain, Mackinnon e Hunter (1989), os resultados obtidos expressam a perda funcional em termos percentuais, sendo que o valor 0 (zero) representa a função normal ou ausência de disfunção e o valor -100 (menos cem) representa a perda total da função do nervo. Portanto, quanto mais próximo de 0 (zero) o valor obtido, melhor a função.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, para verificar as pressuposições dos testes estatísticos, foi aplicado para todas as variáveis analisadas, o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida, como os dados contemplaram a metodologia paramétrica, foi utilizado para análise de variância do Índice Funcional do Ciático e análise morfométrica do nervo, o teste ANOVA *One-way* seguido de teste de Tukey HSD, para as comparações intergrupos.

Para averiguar as diferenças intragrupos das variáveis do Índice Funcional do Ciático, utilizou-se o teste ANOVA *Two-way* seguido do teste de Tukey HSD, visando analisar a recuperação funcional no decorrer do tempo em cada grupo.

Por fim, aplicou-se o coeficiente de correlação de Spearman (r_s Spearman) quando os dados não atenderam a normalidade e, quando os dados

foram normais, aplicou-se o coeficiente de correlação de Pearson (r Pearson) para determinar a correlação entre as variáveis morfométricas do nervo e a função no tempo em cada grupo.

Os dados foram processados no *software Stastical Package for Social Science for Personal Computer* (SPSS/PC versão 11.0) e BioEstat 4.0[®], considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO PILOTO

Em estudo piloto realizado no Laboratório de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), cinco animais desnervados foram sacrificados após 6 dias da lesão, com finalidade de comprovar a eficácia do protocolo utilizado para produzir lesão nervosa do tipo axoniotmese.

Todos os animais apresentaram na porção distal do nervo (Figura 10B) intensa degeneração axonal, representada pela retração e degeneração das bainhas de mielina, presença de células fagocíticas, principalmente macrófagos, além de espessamento do tecido conjuntivo perineural em relação ao grupo controle (Figura 10A).

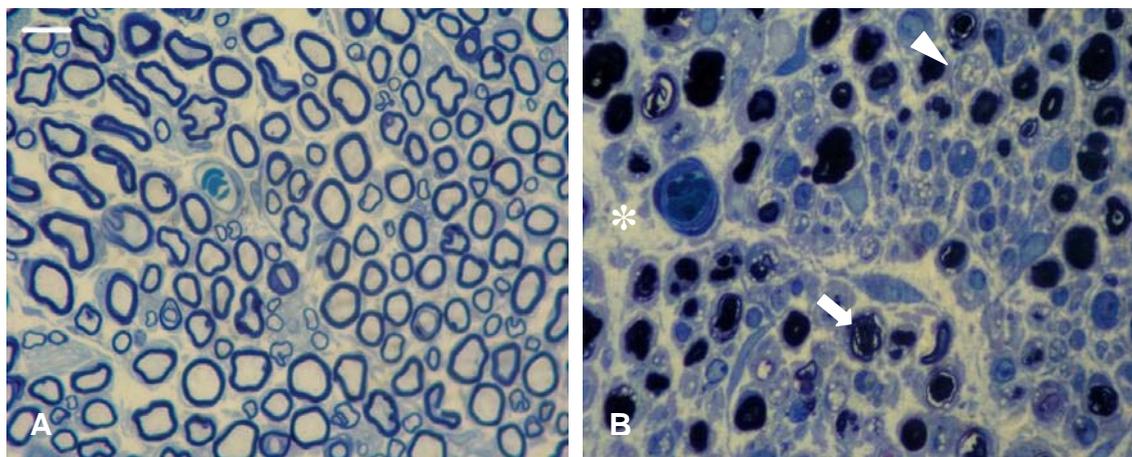


Figura 10 - Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático: A: Nervo Normal, B: após 6 dias da lesão por esmagamento, observando-se degeneração axonal (seta), presença de macrófagos (cabeça da seta) e distribuição do tecido conjuntivo perineural (asterisco).

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As características histológicas do nervo nos animais do grupo controle (Figura 11A) estavam compatíveis com as de um nervo normal, apresentando axônios mielínicos com bainhas de mielina regulares e uniformes e de espessura proporcional ao diâmetro axonal. Observou-se também, a presença de vasos sanguíneos.

A análise do segmento nervoso distal após 22 dias do esmagamento, mostrou axônios regenerados com menor calibre e menor espessura de mielina, bem como maior proporção de área de tecido conjuntivo perineural nos diferentes grupos (Figura 11 B, C, D e E).

Observa-se na figura 11 B a presença de axônios regenerados, porém com menor diâmetro e bainhas de mielina mais delgadas. Na figura 11C, observou-se predomínio de fibras de pequeno calibre e bainhas de mielina delgadas, semelhantes às características do grupo desnervado (Figura 11B). A figura 11 D, mostra que o diâmetro dos axônios e espessura das bainhas de mielina apresentam padrão semelhante ao grupo controle. Na figura 11E evidencia-se a presença de fibras nervosas regeneradas, cujos diâmetros apresentam maior variabilidade, porém preservando a proporcionalidade entre diâmetro do axônio e espessura da bainha de mielina. Além disso, também é evidente o espessamento da bainha perineural.

5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA

5.3.1 Número de Axônios

O número médio de axônios foi de 7477 \pm 1858,41 no grupo C; 11907 \pm 2937,14 no grupo D; 15818 \pm 1970,21 no grupo DE; 13807 \pm 2177,91 no grupo DN e 13556 \pm 1752,12 no grupo DNE. Todos os grupos apresentaram valores médios significativamente maiores que o grupo controle ($p < 0,01$). Além disso, o grupo DE apresentou valores maiores quando comparado ao grupo D ($p < 0,05$) (Figura 12).

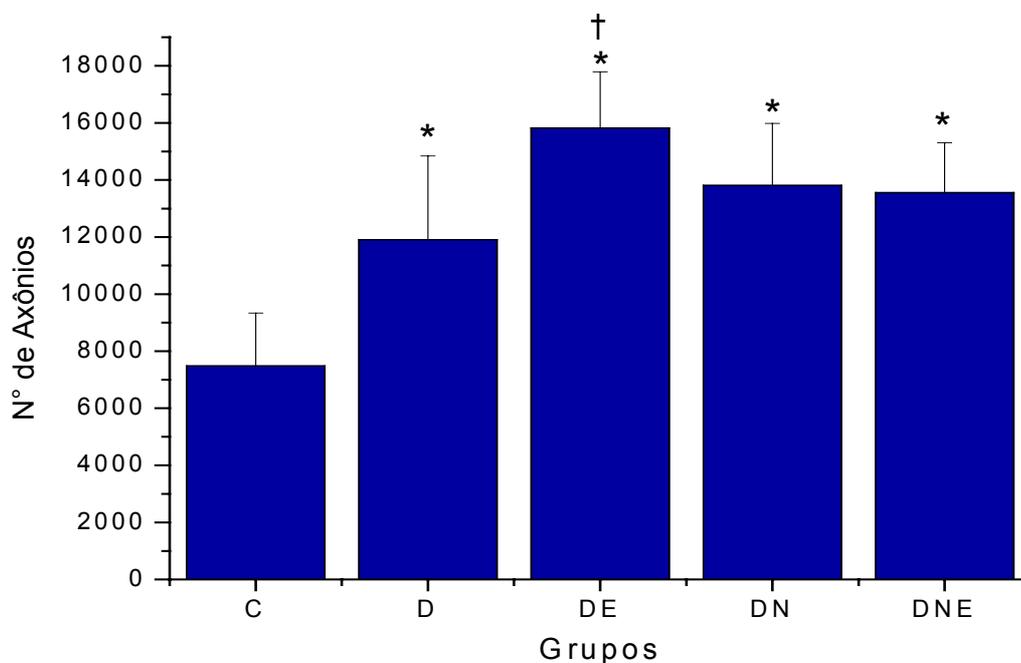


Figura 12 - Valores médios \pm DP do número de axônios nos grupos: Controle (C) e após 22 dias da lesão: Desnervado (D), Desnervado + Eletroestimulação (DE), Desnervado + Natação (DN) e Desnervado + Natação + Eletroestimulação (DNE). (*) Difere significativamente do C ($p < 0,01$); (†) Difere significativamente do D ($p < 0,05$).

5.3.2 Análise Morfométrica

A figura 13 expressa o diâmetro médio dos axônios, sendo $6,324 \pm 0,36\mu\text{m}$ no grupo C; $3,456 \pm 0,64\mu\text{m}$ no grupo D; $3,675 \pm 0,41\mu\text{m}$ no grupo DE; $4,345 \pm 0,69\mu\text{m}$ no grupo DN e $4,048 \pm 0,38\mu\text{m}$ no grupo DNE. Todos os grupos apresentaram valores médios significativamente menores que o grupo controle ($p < 0,01$). Por outro lado, o grupo DN apresentou diâmetro médio dos axônios significativamente maior que o grupo D ($p < 0,05$).

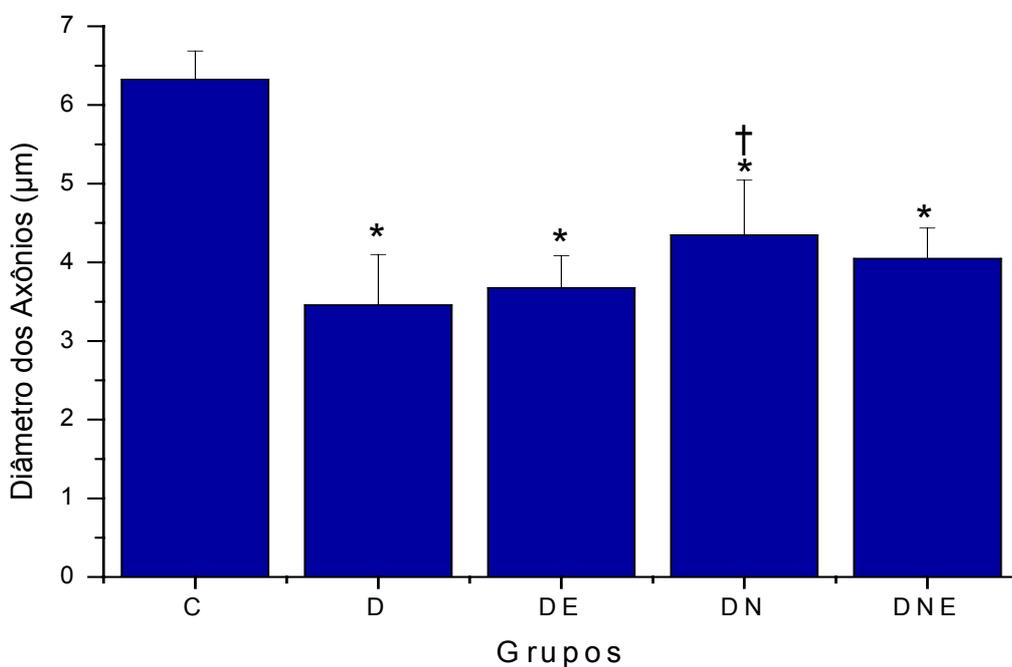


Figura 13 - Valores médios \pm DP do diâmetro dos axônios nos grupos: Controle (C) e após 22 dias da lesão: Desnervado (D), Desnervado + Eletroestimulação (DE), Desnervado + Natação (DN) e Desnervado + Natação + Eletroestimulação (DNE). (*) Difere significativamente do C ($p < 0,01$); (†) Difere significativamente do D ($p < 0,05$).

Na figura 14, os valores médios do diâmetro das fibras nervosas foram: $10,153 \pm 0,33 \mu\text{m}$ no grupo C; $5,856 \pm 0,48 \mu\text{m}$ no grupo D; $5,860 \pm 0,43 \mu\text{m}$ no grupo DE; $6,659 \pm 1,03 \mu\text{m}$ no grupo DN e $6,442 \pm 0,70 \mu\text{m}$ no grupo DNE. Todos os grupos apresentaram valores médios significativamente menores quando comparados com o grupo controle ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos desnervados.

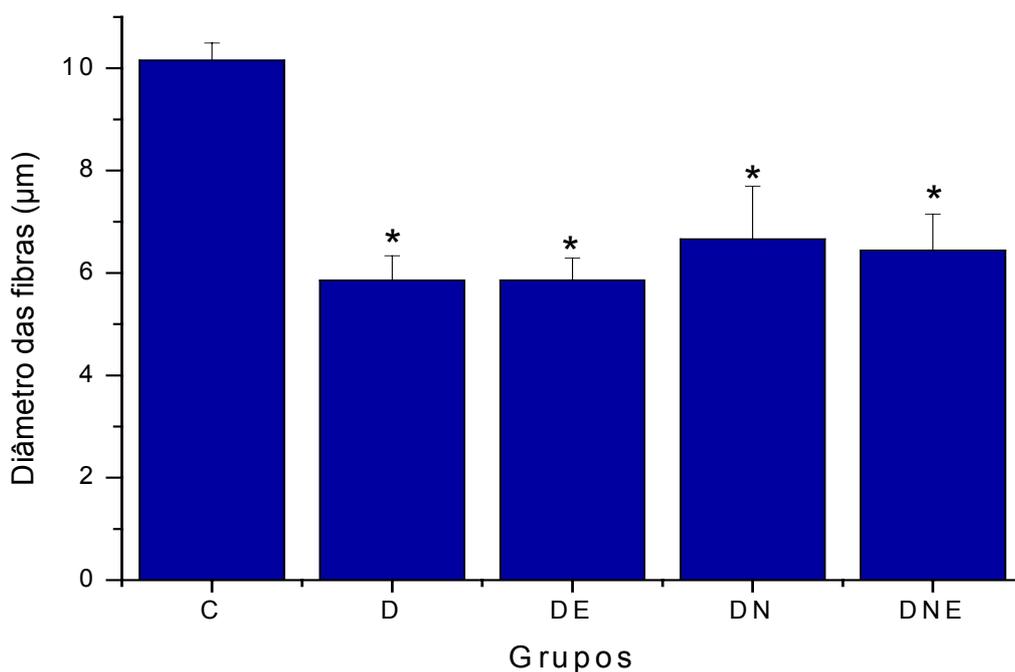


Figura 14 - Valores médios \pm DP do diâmetro das fibras nervosas nos grupos: Controle (C) e após 22 dias da lesão: Desnervado (D), Desnervado + Eletroestimulação (DE), Desnervado + Natação (DN) e Desnervado + Natação + Eletroestimulação (DNE). (*) Difere significativamente do C ($p < 0,01$).

Na figura 15, os valores médios da espessura da bainha de mielina foram: $1,91 \pm 0,14\mu\text{m}$ no grupo C; $1,20 \pm 0,22\mu\text{m}$ no grupo D; $1,09 \pm 0,04\mu\text{m}$ no grupo DE; $1,15 \pm 0,18\mu\text{m}$ no grupo DN e $1,19 \pm 0,17\mu\text{m}$ no grupo DNE. Todos os grupos apresentaram valores médios significativamente inferiores quando comparados com o grupo controle ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos desnervados.

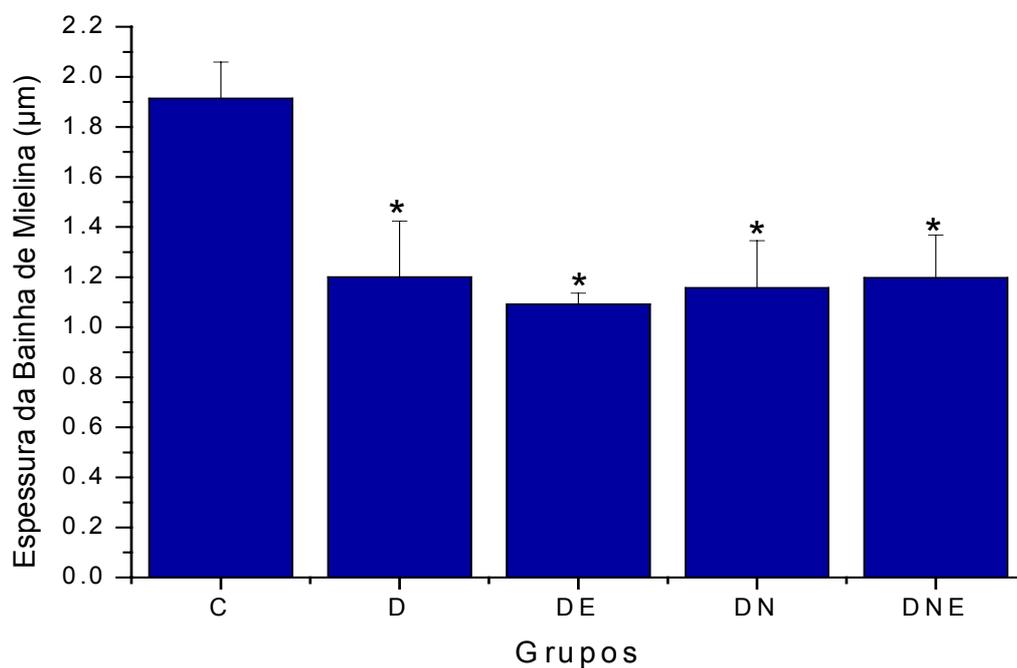


Figura 15 - Valores médios \pm DP da espessura da bainha de mielina nos grupos: Controle (C) e após 22 dias da lesão: Desnervado (D), Desnervado + Eletroestimulação (DE), Desnervado + Natação (DN) e Desnervado + Natação + Eletroestimulação (DNE). (*) Difere significativamente do C ($p < 0,01$).

A figura 16 expressa os valores de razão G nos diferentes grupos estudados. Estes valores foram de $0,62 \pm 0,02$ no grupo C; $0,58 \pm 0,08$ no grupo D; $0,62 \pm 0,02$ no grupo DE; $0,65 \pm 0,02$ no grupo DN e $0,62 \pm 0,01$ no grupo DNE. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

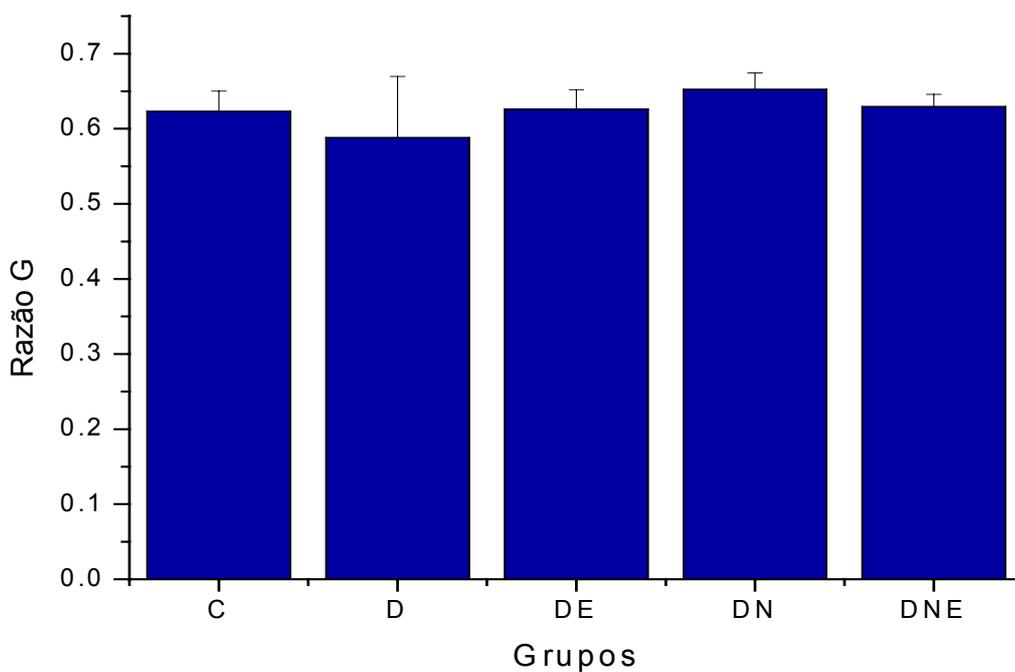


Figura 16 - Valores médios \pm DP da razão G nos grupos: Controle (C) e após 22 dias da lesão: Desnervado (D), Desnervado + Eletroestimulação (DE), Desnervado + Natação (DN) e Desnervado + Natação + Eletroestimulação (DNE), ($p > 0,05$).

5.4 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA

5.4.1 Análise Intragrupos

Os valores médios do IFC para o grupo D foram: $-14,98 \pm 13,07$ no pré-operatório, $-70,25 \pm 28,84$ no 7° dia, $-75,49 \pm 13,67$ no 14° dia e $-19,18 \pm 14,14$ no 21° dia pós-operatório. No grupo DN, esses valores foram: $-2,21 \pm 11,56$ no pré-operatório, $-57,65 \pm 25,91$ no 7° dia, $-67,95 \pm 22,16$ no 14° dia e $-17,84 \pm 10,10$ no 21° dia pós-operatório. O grupo DE apresentou IFC de $-9,25 \pm 6,09$ no período pré-operatório, $-75,83 \pm 10,92$ no 7° dia, $-70,13 \pm 9,02$ no 14° dia e $-8,55 \pm 20,38$ no 21° dia pós-operatório. No grupo DNE, o IFC foi de $-2,28 \pm 11,27$ no período pré-operatório, $-63,47 \pm 14,65$ no 7° dia, $-61,04 \pm 12,31$ no 14° dia e $-21,44 \pm 14,71$ no 21° dia pós-operatório.

Na análise intragrupos dos valores do IFC nos diferentes períodos de avaliação (Figura 17), foi observado que em todos os grupos experimentais o IFC diferiu significativamente no 7° e 14° dias pós-operatório quando comparados com o pré-operatório e com o 21° dia após a lesão ($p < 0,01$). Além disso, os valores do grupo DNE no 21° dia PO, foram significativamente mais negativos quando comparados com o período pré-operatório ($p < 0,05$).

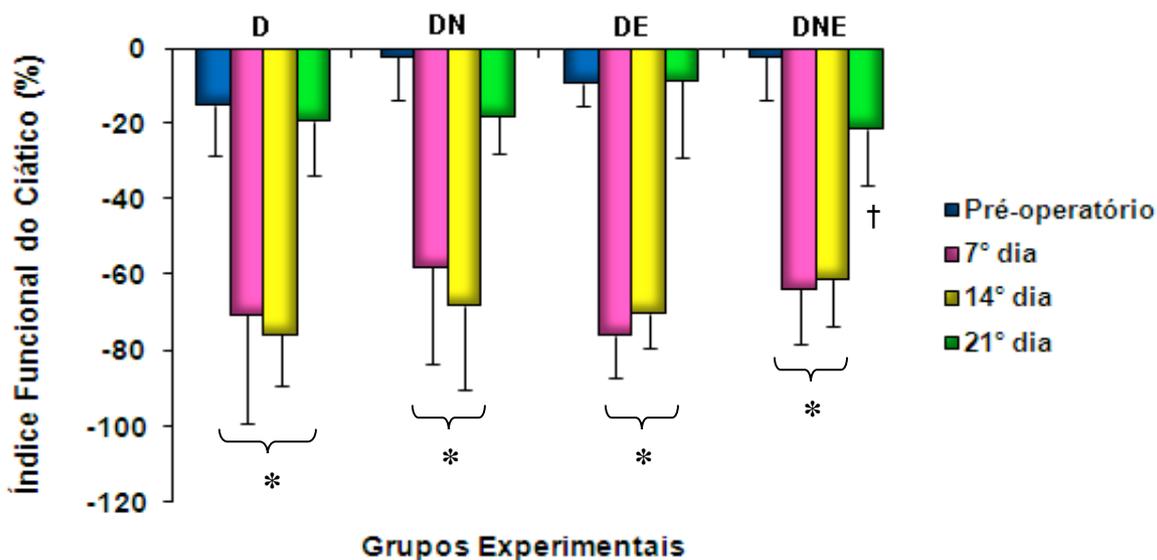


Figura 17 - Comparações intragrupos do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos grupos: Desnervado (D), Desnervado + Natação (DN), Desnervado + Eletroestimulação (DE) e Desnervado + Natação + Eletroestimulação (DNE), nos diferentes tempos. (*) Difere do pré-operatório e 21º dia PO ($p < 0,01$); (†) Difere do pré-operatório ($p < 0,05$).

5.4.2 Análise Intergrupos

Na análise intergrupos dos valores de IFC (Figura 18), verifica-se que todos os grupos experimentais apresentaram o mesmo padrão funcional, isto é, no período pré-operatório os valores do IFC refletiram função normal, enquanto que no 7º e 14º dias PO, esses valores diminuíram, indicando perda funcional expressiva e alcançaram valores próximos ao valor do pré-operatório no 21º dia, sugerindo recuperação funcional. Os resultados, não expressaram diferença estatística entre os grupos em todos os períodos analisados: pré-operatório ($p=0,15$), 7º dia ($p=0,50$), 14º dia ($p=0,55$) e 21º dia ($p=0,50$) pós-operatório.

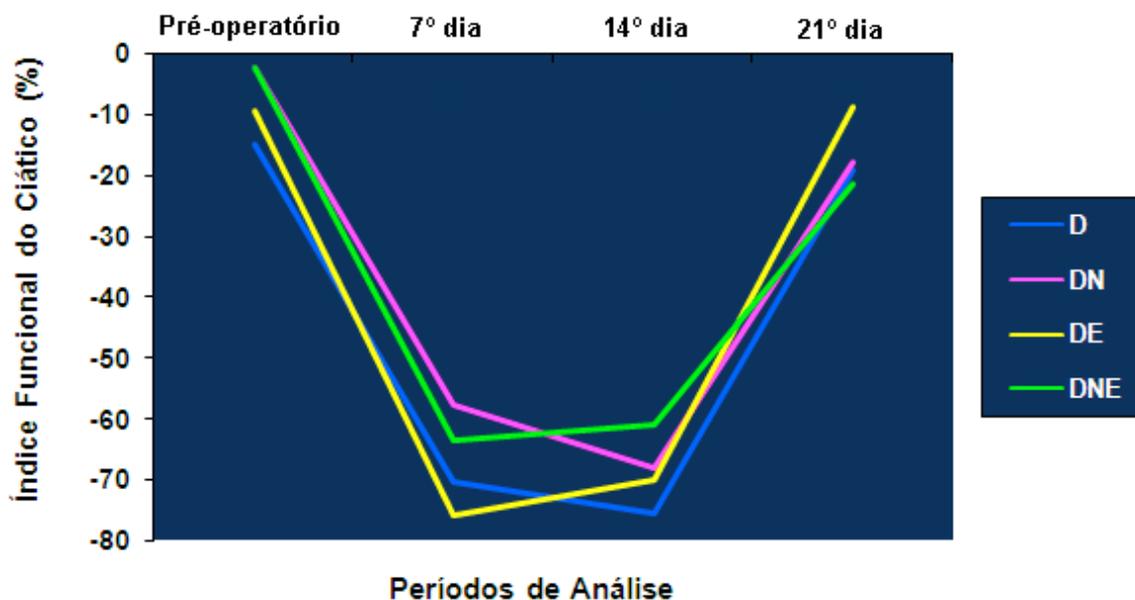


Figura 18 - Comparações intergrupos dos períodos de análise do Índice Funcional do Ciático (IFC): Desnervado (D); Desnervado + Natação (DN); Desnervado + Eletroestimulação (DE) e Desnervado + Natação + Eletroestimulação (DNE); ($p > 0,05$).

5.4.3 Análise dos Registros das Pegadas

Na análise dos registros das pegadas das patas normal (N) e experimental (E), observa-se uma evolução semelhante em todos os grupos durante os diferentes períodos de avaliação por meio do IFC.

Na comparação dos registros das pegadas no período pré-operatório com o 7º dia pós-lesão (Figura 19), verifica-se um aumento do parâmetro PL e uma diminuição dos parâmetros TS e ITS. Já na comparação dos registros das pegadas no período pré-operatório com o 21º dia pós-lesão (Figura 20), observa-se uma semelhança entre as pegadas nestes diferentes períodos de avaliação, mostrando um bom grau de recuperação funcional.

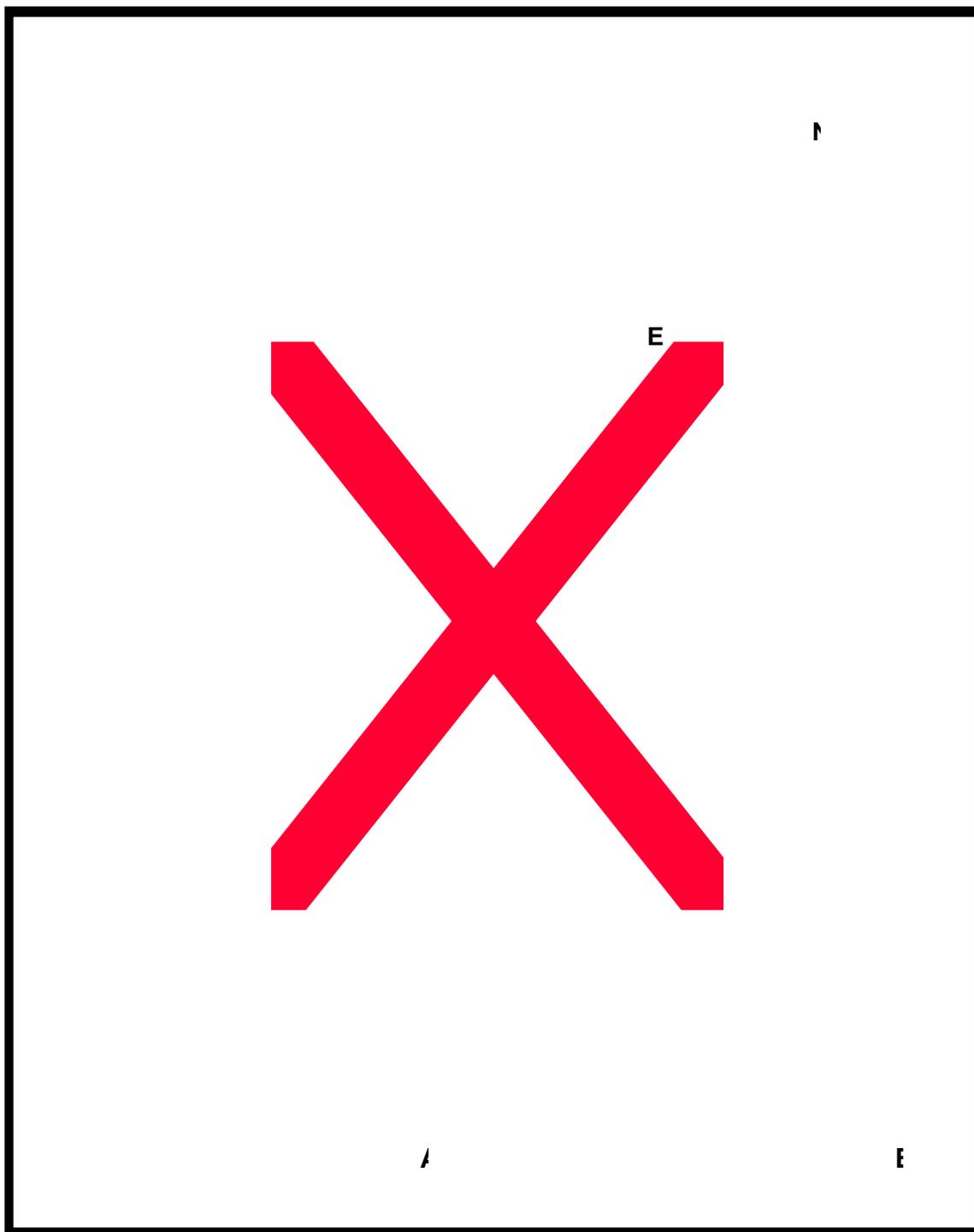


Figura 19 - Registro das pegadas das patas normal (N) e experimental (E) na avaliação do IFC no período pré-operatório (A) e 7º dia pós-operatório (B).

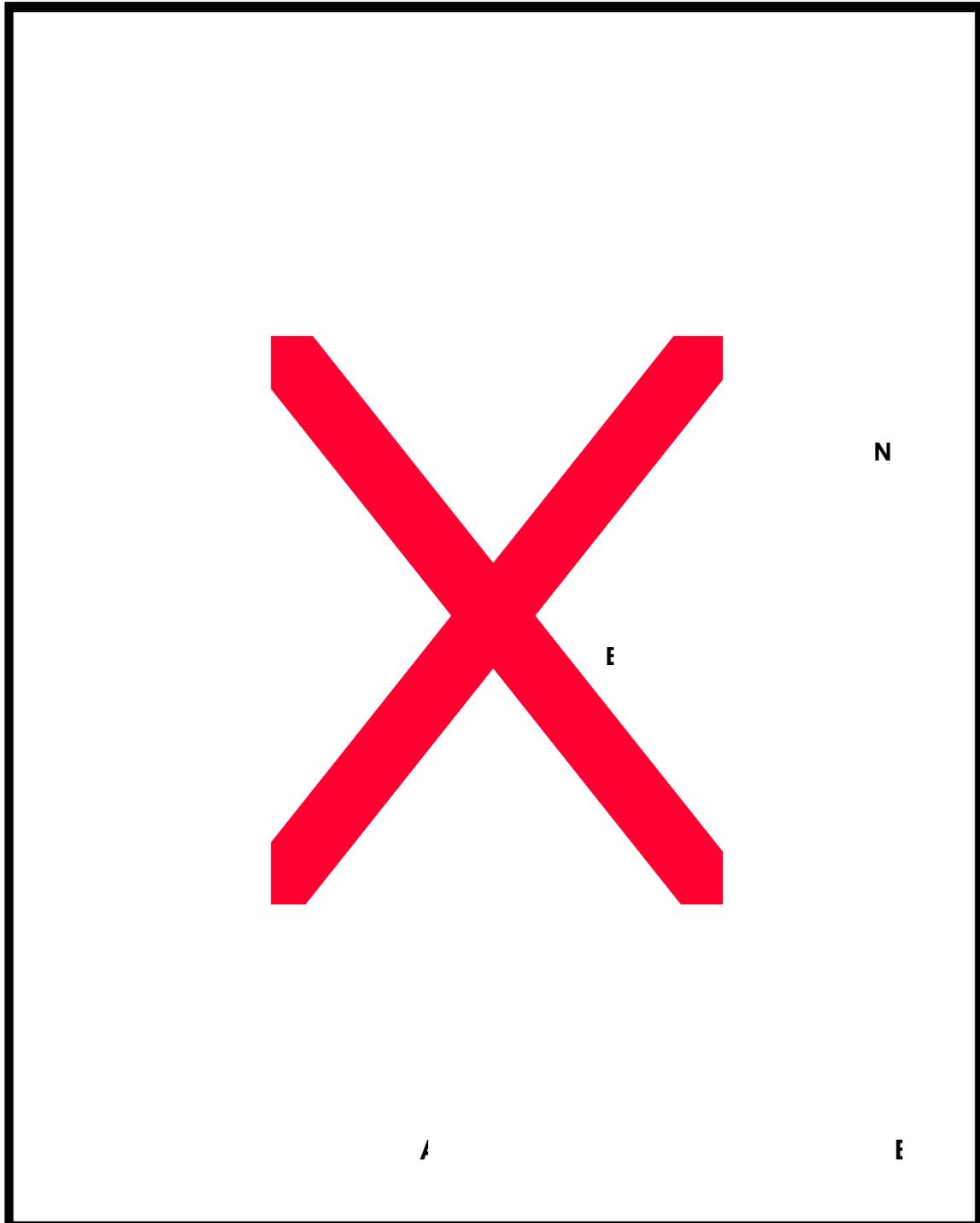


Figura 20 - Registro das pegadas das patas normal (N) e experimental (E) na avaliação do IFC no período pré-operatório (A) e 21° dia pós-operatório (B).

5.5 CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS E O IFC

Na Tabela 1 foram expressos os valores de correlação entre as variáveis morfométricas e o IFC, no período pré-operatório, no grupo Controle (C).

Os valores do diâmetro do axônio apresentaram correlação linear com a razão G ($r = 0,808$; $p = 0,052$) fortemente positiva e com o IFC ($r = -0,888$; $p = 0,018$) fortemente negativa, bem como os valores de razão G com a espessura da bainha de mielina ($r_s = -0,824$; $p = 0,044$). Tais correlações não foram observadas entre as outras variáveis neste grupo ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Correlações entre as variáveis morfométricas e o IFC no período pré-operatório no grupo Controle (C).

	Ø Fibra	Esp. Mielina	Ø Axônio	Nº Axônios	IFC- pré	Razão G
Ø Fibra	1					
Esp. Mielina	-0,059	1				
Ø Axônio	0,656	-0,588	1			
Nº Axônios	-0,434	-0,765	0,013	1		
IFC- pré	-0,717	0,667	-0,888*	-0,124	1	
Razão G	0,087	-0,824*	0,808*	0,349	-0,606	1

Ø Fibra = diâmetro da fibra; Esp. Mielina = espessura da bainha de mielina; Ø Axônio = diâmetro do axônio; Nº Axônios = número de axônios; IFC-pré = Índice Funcional do Ciático no período pré-operatório. (*) $p < 0,05$.

Na Tabela 2 foram expressos os valores de correlação entre as variáveis morfométricas e o IFC após 21 dias PO no grupo Desnervado (D).

Os valores de razão G apresentaram correlação linear com o IFC ($r = -0,812$; $p = 0,05$) e espessura da bainha de mielina ($r = -0,915$; $p = 0,010$) fortemente negativas, porém fortemente positiva com o diâmetro do axônio ($r = 0,907$; $p = 0,012$). Tais correlações não foram observadas entre as outras variáveis neste grupo ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Correlações entre as variáveis morfométricas e o IFC após o 21º dia PO no grupo Desnervado (D).

	Ø Fibra	Esp. Mielina	Ø Axônio	Nº Axônios	IFC-21º	Razão G
Ø Fibra	1					
Esp. Mielina	0,039	1				
Ø Axônio	0,721	-0,663	1			
Nº Axônios	-0,732	0,134	-0,641	1		
IFC-21º	-0,390	0,706	-0,781	0,574	1	
Razão G	0,364	-0,915*	0,907*	-0,429	-0,812*	1

Ø Fibra = diâmetro da fibra; Esp. Mielina = espessura da bainha de mielina; Ø Axônio = diâmetro do axônio; Nº Axônios = número de axônios; IFC-21º = Índice Funcional do Ciático no 21º dia PO. (*) $p < 0,05$.

Na Tabela 3 foram expressos os valores de correlação entre as variáveis morfométricas e o IFC após 21 dias PO no grupo Desnervado + Natação (DN).

Os valores de razão G apresentaram correlação linear com o IFC ($r = 0,845$; $p = 0,034$) e diâmetro do axônio ($r_s = 0,829$; $p = 0,042$) fortemente positivas. Tais correlações não foram observadas entre as outras variáveis neste grupo ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Correlações entre as variáveis morfométricas e o IFC após o 21º dia PO no grupo Desnervado + Natação (DN).

	Ø Fibra	Esp. Mielina	Ø Axônio	Nº Axônios	IFC-21º	Razão G
Ø Fibra	1					
Esp. Mielina	0,371	1				
Ø Axônio	0,6	-0,086	1			
Nº Axônios	0,257	0,086	0,029	1		
IFC-21º	-0,086	-0,6	0,314	0,303	1	
Razão G	0,371	-0,543	0,829*	-0,017	0,845*	1

Ø Fibra = diâmetro da fibra; Esp. Mielina = espessura da bainha de mielina; Ø Axônio = diâmetro do axônio; Nº Axônios = número de axônios; IFC-21º = Índice Funcional do Ciático no 21º dia PO. (*) $p < 0,05$.

Na Tabela 4 foram expressos os valores de correlação entre as variáveis morfométricas e o IFC após 21 dias PO no grupo Desnervado + Eletroestimulação (DE).

Os valores de razão G apresentaram correlação linear com o diâmetro do axônio ($r= 0,940$; $p= 0,005$) e diâmetro da fibra ($r= 0,853$; $p= 0,031$) fortemente positivas, bem como os valores do diâmetro do axônio com o diâmetro da fibra ($r= 0,979$; $p= 0,001$). Tais correlações não foram observadas entre as outras variáveis neste grupo ($p>0,05$).

Tabela 4 - Correlações entre as variáveis morfométricas e o IFC após o 21º dia PO no grupo Desnervado + Eletroestimulação (DE).

	Ø Fibra	Esp. Mielina	Ø Axônio	Nº Axônios	IFC-21º	Razão G
Ø Fibra	1					
Esp. Mielina	0,329	1				
Ø Axônio	0,979*	0,132	1			
Nº Axônios	-0,323	-0,607	-0,210	1		
IFC-21º	-0,574	-0,491	-0,498	0,410	1	
Razão G	0,853*	-0,208	0,940*	0,042	-0,311	1

Ø Fibra = diâmetro da fibra; Esp. Mielina = espessura da bainha de mielina; Ø Axônio = diâmetro do axônio; Nº Axônios = número de axônios; IFC-21º = Índice Funcional do Ciático no 21º dia PO. (*) $p<0,05$.

Na Tabela 5 foram expressos os valores de correlação entre as variáveis morfométricas e o IFC após 21 dias PO no grupo Desnervado + Natação + Eletroestimulação (DNE).

Os valores do diâmetro do axônio apresentaram correlação linear com o diâmetro da fibra ($r= 0,973$; $p= 0,001$) e espessura da bainha de mielina ($r= 0,880$; $p= 0,021$) fortemente positivas, assim como o diâmetro da fibra com a espessura da bainha de mielina ($r= 0,965$; $p= 0,002$). Os valores de razão G apresentaram correlação fortemente negativa com o número de axônios ($r= -0,808$; $p= 0,052$).

Tais correlações não foram observadas entre as outras variáveis neste grupo ($p > 0,05$).

Tabela 5 - Correlações entre as variáveis morfométricas e o IFC após o 21º dia PO no grupo Desnervado + Natação + Eletroestimulação (DNE).

	\varnothing Fibra	Esp. Mielina	\varnothing Axônio	Nº Axônios	IFC-21º	Razão G
\varnothing Fibra	1					
Esp. Mielina	0,965*	1				
\varnothing Axônio	0,973*	0,880*	1			
Nº Axônios	0,223	0,435	0,022	1		
IFC-21º	-0,390	-0,415	-0,345	-0,110	1	
Razão G	-0,558	-0,754	-0,352	-0,808*	0,319	1

\varnothing Fibra = diâmetro da fibra; Esp. Mielina = espessura da bainha de mielina; \varnothing Axônio = diâmetro do axônio; Nº Axônios = número de axônios; IFC-21º = Índice Funcional do Ciático no 21º dia PO. (*) $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

6.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Diversas espécies animais são empregadas em estudos experimentais, no entanto, o rato é utilizado em cerca de 90% destes, por ser de pequeno porte, baixo custo e de fácil manuseio (Fagundes e Taha, 2004; Schanaider e Silva, 2004; Varejão et al., 2004, Mazzer et al., 2006), bem como, por apresentar um sistema nervoso semelhante aos dos seres humanos, com exceção de características como tamanho e densidade tecidual (Bridge et al., 1994). Contudo, o nervo isquiático do rato destaca-se para estudos de lesões nervosas periféricas, devido à sua grande quantidade de fascículos, fibras nervosas e densa irrigação sanguínea, a qual se assemelha a dos nervos periféricos de humanos, ao seu fácil acesso cirúrgico, rápida capacidade de regeneração, além de permitir avaliação da função sensorial e motora (Oliveira et al., 2001; Varejão et al., 2001, 2004).

Considerando esses fatos, optou-se por utilizar neste estudo ratos machos da linhagem *Wistar*, com idade de 6 a 7 semanas, por serem considerados jovens, apresentando maior taxa de regeneração nervosa e recuperação funcional que animais idosos, uma vez que as características morfológicas e funcionais são influenciadas pela idade (Ceballos et al., 1999; Verdú et al., 2000).

Ratos machos foram preferidos às fêmeas para evitar mudanças fisiológicas associadas ao ciclo estral, visto que este pode afetar o comportamento motor pela alteração da intensidade da ambulação, podendo interferir no procedimento experimental durante a coleta do IFC e

conseqüentemente influenciar nos resultados do estudo (Gouveia Jr. e Morato, 2002).

6.2 MODELO DE LESÃO E PERÍODO DE ANÁLISE

A combinação de Cloridrato de Cetamina (15 a 100mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (3 a 10mg/Kg) por via intramuscular ou intraperitoneal é comumente utilizada em animais de pequeno porte, pois permite mantê-los sob anestesia por um período de 40 a 60 minutos, sendo possível o reforço da dose, atuando na imobilização do animal, sem perda total dos reflexos protetores, além de proporcionar analgesia (Schnaider e Silva, 2004).

A dosagem do anestésico em relação ao tempo de absorção já havia sido determinada em estudo piloto realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa da instituição, quando se observou que a combinação de Ketalar[®] (Cloridrato de Cetamina) 50mg/mL e Rompun[®] (Cloridrato de Xilazina) 2g/100 mL, na dose de 0,3mL/100g de peso corporal, por via intramuscular, mantinha os animais imobilizados por um período aproximado de 50 minutos, considerado tempo suficiente para realização do procedimento cirúrgico.

O interesse em escolher o modelo de lesão por esmagamento justifica-se por serem lesões relativamente freqüentes na clínica e por ser um modelo experimentalmente viável e reproduzível para avaliação do processo regenerativo, apresentando vantagens para o sucesso da regeneração axonal, visto que a estrutura de sustentação dos nervos permanece íntegra, não necessitando de reparo cirúrgico, o que evita a entrada de substâncias deletérias no sítio da lesão, como é observado na lesão por secção (Bridge et al., 1994; Robinson, 2000; Gordon, Sulaiman e Boyd, 2003; Mazzer et al., 2006).

Considerando as características estruturais do nervo, houve preocupação neste estudo em avaliar o material utilizado para promover a lesão por esmagamento. Assim, o nervo isquiático dos animais foi esmagado utilizando-se uma pinça hemostática Erwin-Guth[®] de 12 cm, cujas faces de contato foram protegidas e a pressão de pinçamento padronizada até o terceiro dente da cremalheira da pinça.

Bridge et al. (1994), em estudo semelhante investigaram seis diferentes técnicas para produzir lesões por esmagamento do nervo isquiático de ratos, utilizando pinças hemostáticas e de relojoeiro, em tempos distintos de aplicação de pressão. Constataram que não houve diferença significativa entre as técnicas, independente do tipo de pinça utilizada, pois todos os grupos apresentaram lesões do tipo axoniotmese, sendo considerado um método confiável e reproduzível. Entretanto, a pressão aplicada não poderia ser precisamente quantificada.

Estes resultados foram corroborados por Beer, Steurer e Meyer (2001) citado por Mazzer et al. (2006) que observaram que as respostas fisiológicas e funcionais para o esmagamento pareceram ser a mesma utilizando pinça não serrilhada com forças pré-determinadas aplicadas ao nervo para produzir lesões de segundo grau.

A literatura ainda aponta uma variedade de métodos empregados para realizar o esmagamento nervoso em animais, no entanto não há uma padronização no tempo de aplicação do esmagamento, variando de 2 segundos a 24h, bem como no comprimento do segmento lesado, o que dificulta a comparação entre os estudos (Mazzer et al., 2006). Entretanto, Dash et al. (1996) examinaram os efeitos funcionais e histológicos do nervo isquiático de ratos

esmagado por 5 segundos com pinça hemostática. Os autores observaram diminuição da função até a 2ª semana após a lesão, a qual alcançou os níveis controle na 3ª semana, concluindo que nas lesões por esmagamento, as respostas fisiológicas e funcionais do nervo são semelhantes mesmo quando se aplicam diferentes métodos e a recuperação funcional ocorre aproximadamente no mesmo período de tempo, independente do tempo de duração do esmagamento.

Neste estudo, para verificar se a pressão e o tempo de duração do esmagamento eram suficientes para causar degeneração Walleriana, sem ruptura dos envoltórios conjuntivos do nervo, um grupo denominado Desnervado 6 dias (D6) teve o nervo distal à lesão analisado histologicamente 6 dias após o esmagamento. A presença de degeneração com preservação dos envoltórios conjuntivos do nervo sugere que o instrumento utilizado para provocar a lesão é confiável.

Nos demais grupos propostos, o segmento distal dos nervos isquiáticos foi analisado após 22 dias de sobrevida, considerando os achados de Carmignoto et al. (1983) e Gorio et al. (1983), que apontam uma seqüência temporal da regeneração após esmagamento em ratos. Os autores observaram que aos 10 dias nenhum axônio é evidenciado no músculo e que o processo de reinervação muscular inicia-se 2 semanas após o esmagamento, quando 25% das fibras encontram-se poliinervadas. Entre 21 e 25 dias, observa-se o pico de poliinervação, quando o potencial de repouso da membrana muscular, a força de contração, a sensibilidade à acetilcolina e os níveis de acetilcolinesterase voltaram ao normal, mostrando que a função motora está parcialmente recuperada. Aos 26 dias da lesão, a eliminação sináptica é iniciada e até o 60º

dia, as fibras tornam-se monoinervadas. Por volta dos 90 dias, o tamanho das junções neuromusculares é recuperado, ocupando quase completamente a fenda pós-sináptica.

Essa seqüência temporal da regeneração após esmagamento em ratos justifica o tempo de duração da intervenção aplicada neste estudo, ou seja, 22 dias de intervenção, visando identificar as possíveis influências do exercício de natação e da eletroestimulação, bem como da associação de ambos sobre o processo de regeneração nervosa e recuperação funcional, uma vez que a reinervação muscular já estaria ocorrendo, devido à presença de axônios na porção distal à lesão nervosa e a possibilidade de contração dos músculos anteriormente desnervados.

Os resultados obtidos do IFC neste estudo no decorrer do processo de regeneração nervosa e reinervação muscular reafirmam a eficácia do modelo de lesão, pois aos 7 dias da lesão a funcionalidade era ausente, cursando com recuperação progressiva a partir do 14º dia. Um procedimento utilizando material inadequado para promover a lesão ou pressão excessiva poderia causar rompimento das bainhas conjuntivas e perda de rota dos axônios em regeneração, o que refletiria negativamente no nível de recuperação funcional.

6.3 PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

A estimulação elétrica é de uso corrente na clínica, especialmente após lesão nervosa periférica, onde o comprometimento da função sensório-motora é relevante e de instalação rápida, sendo às vezes, irreversível, o que dificulta a recuperação funcional (Gordon, Sulaiman e Boyd, 2003; Sheffler e Chae, 2007). Na literatura, há relatos do uso da estimulação elétrica em humanos, mostrando

seus benefícios sobre o tecido muscular, como retardo da atrofia e aumento da força (Woodcock, Taylor e Ewins, 1999; Kern et al., 2002; Sheffler e Chae, 2007).

Embora a estimulação elétrica seja um recurso físico de importância para a reabilitação, a variabilidade dos parâmetros e do tempo de aplicação torna difícil a comparação entre os resultados (Cheng e Lin, 2004).

A maioria dos trabalhos experimentais utiliza a estimulação elétrica crônica com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios da desnervação. No entanto, este procedimento é considerado inviável na clínica, pois exige períodos superiores a 8 horas/dia de estimulação (Al-Majed et al., 2000; Brushart et al., 2002; Marqueste et al., 2006).

A estimulação elétrica crônica tem proporcionado benefícios ao músculo desnervado (Dow et al., 2004; Marqueste et al., 2006). Entretanto, estudos apontam que quando aplicada no nervo proximal à lesão, promove efeitos positivos no crescimento axonal (Nix e Hopf, 1983; Al-Majed et al., 2000; Brushart et al., 2005) e, quando aplicada sobre o músculo, atrasa o processo de reinervação muscular (Tam et al., 2001; Lieber, 2002).

Considerando a viabilidade para a clínica, optou-se por utilizar neste estudo a eletroestimulação muscular fásica de baixa frequência (EMFBF), que se caracteriza por tempo de intervenção em torno de 20 a 30 minutos/dia (Fernandes et al., 2005). Outro aspecto que justifica esta investigação é a escassez de dados na literatura que indiquem os seus benefícios sobre a qualidade de regeneração das fibras nervosas.

Um ponto que deve ser destacado neste estudo é que a EMFBF foi iniciada 24 horas após a lesão, ou seja, na fase aguda. Considerando que após 5 a 6 horas da lesão se evidenciam eventos inflamatórios e degenerativos no nervo

e no músculo, este recurso pode favorecer o processo de cicatrização e reduzir as alterações musculares que se instalam de forma rápida, como a atrofia, presente em músculos de humanos após algumas semanas e, em ratos, mais precocemente (Eberstein e Eberstein, 1996).

Considera-se neste estudo que a recuperação funcional poderia ser facilitada pela eletroestimulação, que fornece impulsos aferentes proprioceptivos e cutâneos associados aos movimentos repetitivos que induzem a potenciação a longo prazo no córtex motor, alterando a excitabilidade dos neurônios motores específicos e facilitando o reaprendizado motor (Sheffler e Chae, 2007). Esse mecanismo de plasticidade neural estaria evidente a partir do 14º dia, quando os neurônios motores inferiores começam a recuperar seu contato com o músculo.

Os parâmetros de eletroestimulação foram estabelecidos em função da característica fenotípica do músculo sóleo ser de contração lenta e a cronaxia ser maior no músculo que no nervo. Como estes parâmetros foram aplicados em estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa e mostraram-se eficazes em reduzir os efeitos deletérios da desnervação sobre o músculo (Silva et al., 1999; Polacow et al., 2003; Guirro et al., 2004; Fernandes et al., 2005, Rocha, 2006), houve interesse de investigar a influência deste protocolo de eletroestimulação aplicado diariamente, sobre a regeneração das fibras nervosas lesadas.

Para que o estímulo elétrico atingisse as fibras musculares desnervadas, que apresentam maior limiar de excitabilidade (Salmons et al., 2005) e também as fibras inervadas, optou-se por utilizar uma forma de pulso quadrada, que promove rápida elevação da amplitude de corrente, recrutando fibras em ambas condições (Bennie et al., 2002).

Músculos desnervados não respondem a correntes com pequenas durações de fase (Guirro e Guirro, 2002; Ashley et al., 2005), necessitando de um tempo de duração de pulso maior que o utilizado em músculos inervados (Ashley et al., 2005). Estudos prévios realizados por Silva et al. (1999) e Fernandes et al. (2005), que eletroestimularam o músculo sóleo de ratos após secção e esmagamento do nervo isquiático, respectivamente, apontam que a duração do pulso de 3ms, permitiu uma contração muscular eficiente do músculo, justificando a escolha desse parâmetro para este estudo.

Geralmente, uma alta amplitude de estimulação leva o músculo a contrair mais fortemente, devido ao recrutamento de maior número de unidades motoras (Bennie et al., 2002). Determinou-se a intensidade de 5mA, pois esta foi suficiente para desencadear uma contração vigorosa do músculo sóleo desnervado, caracterizada pelo movimento de flexão plantar. Para que não houvesse habituação do estímulo e a resposta muscular fosse mantida uniforme durante todo o período de estimulação, foi acrescentado 1mA a cada 5 minutos (Polacow et al., 2003; Fernandes et al., 2005).

Como o músculo sóleo tem predomínio de fibras lentas, foi padronizada a frequência de 10Hz, visto que no trabalho de Lomo, Westgaard e Dahl (1974) observou-se que esta mesma frequência aplicada ao músculo sóleo de ratos conservava as propriedades contráteis do músculo. Quando esses autores utilizaram uma frequência de 100Hz, verificaram que o músculo lento adquiria características de músculo rápido, devido à transição das cadeias pesadas de miosina no sentido de lenta para rápida.

A eletroestimulação foi aplicada durante 30 minutos ao dia, uma vez que na prática clínica os períodos de intervenção seguem esta rotina terapêutica

(Kern et al., 2002). Este protocolo de eletroestimulação diária gerava 18000 pulsos/dia, caracterizados por contrações não tetânicas. Apesar do grande número de contrações geradas durante o período de intervenção, não houve sinais de lesão muscular, conforme constatado por Rocha (2006) em análise do músculo sóleo desnervado e submetido ao mesmo protocolo de eletroestimulação.

É pertinente ressaltar que ao final de 5 dias de eletroestimulação os eletrodos eram substituídos, a fim de evitar a redução do estímulo em consequência do desgaste dos eletrodos pelo tempo de uso, o que causa um aumento da resistência à passagem da corrente (Bolfe, 2007).

6.4 PROTOCOLO DE NATAÇÃO LIVRE

O exercício físico é utilizado na reabilitação de lesões nervosas periféricas, entretanto a maioria dos trabalhos experimentais discute a sua influência sobre o músculo, pois mantém suas propriedades contráteis, metabólicas e bioquímicas durante o período de desnervação (Possebon et al., 2001; Marqueste et al., 2004; Terada e Tabata, 2004; Tanaka, Tsubaki e Tachino, 2005).

Há evidências de que o exercício físico tem efeitos benéficos na regeneração de nervos lesados (Sarikcioglu e Oguz, 2001; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006), entretanto os mecanismos de recuperação funcional permanecem não totalmente esclarecidos, havendo controvérsias sobre o melhor período para iniciar o exercício (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; Sarikcioglu e Oguz, 2001; Tam et al., 2001) e sobre a intensidade do mesmo (Soucy, Seburn e Gardiner, 1996; Sakakima et al., 2004).

Considerando que ratos apresentam habilidade natural para nadar (Gobatto et al., 2001), não houve necessidade de uma seleção prévia dos animais que seriam submetidos ao protocolo de natação.

Os animais realizaram natação em grupo, pois segundo Ueno et al. (1997) e Nakao et al. (2000) a natação em grupo promove exercício mais vigoroso que individualmente.

O modelo de tanque circular de capacidade de 500L e profundidade de 60 cm (Carvalho, 2001) foi relevante para o propósito do estudo, pois permitiu que os animais se exercitassem durante todo o tempo da sessão, além de possibilitar que maior número de animais fosse exercitado simultaneamente sob as mesmas condições experimentais. Vieira et al. (1988) desenvolveram um sistema de natação onde os animais nadavam em tanques individuais construídos com tubos de PVC de 250mm de diâmetro. Nessa condição, os animais se mantinham na superfície da água sem movimentar-se ou movimentando pouco os membros, o que representava uma desvantagem para o exercício.

Previamente à lesão nervosa foi realizada uma semana de adaptação dos animais ao ambiente aquático para familiarizá-los ao futuro protocolo, evitando o estresse, sem no entanto, promover acomodações físicas (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; Gobatto et al., 2001; Voltarelli, Gobatto e Mello, 2002; Manchado et al., 2006). Os parâmetros como água rasa (30 cm de profundidade) e não adição de cargas ao tórax ou à cauda dos animais, foram baseados no estudo de Gobatto et al. (2001), visando prevenir o esforço intenso do animal antes do início do protocolo. O aumento progressivo do tempo de exercício, diariamente, atingindo 60 minutos no 5º dia da adaptação, foi realizado de acordo com Voltarelli, Gobatto e Mello (2002).

A água foi mantida a $31 \pm 2^\circ\text{C}$ por ser uma temperatura neutra, proporcionando pequena alteração metabólica e por permitir que os animais mantivessem sua temperatura corporal estável (Harri e Kuusela, 1986; Manchado et al., 2006).

Considerando que o objetivo de realizar mobilização dos músculos desnervados foi investigar a regeneração nervosa, evitando o estresse, o protocolo de exercício proposto não se baseou totalmente em estudos que realizam exercício de natação, pois apesar da grande quantidade de relatos com esta modalidade de exercício, a maioria utiliza a natação como treinamento, não se preocupando com sua repercussão sobre o processo de regeneração e recuperação funcional (Herbison, Jaweed e Dittuno, 1974; Nakao et al., 2000; Possebon et al., 2001; Manchado et al., 2006).

A natação foi iniciada 24 horas após a lesão, ou seja, na fase aguda, considerando que os eventos degenerativos têm início logo após a lesão, (especialmente a atrofia muscular) evoluindo progressivamente e causando comprometimento da função motora (Eberstein e Eberstein, 1996).

Van Meeteren et al. (1997a) realizaram exercício voluntário 24 horas após a lesão e verificaram melhora da função sensório-motora após esmagamento do nervo isquiático, persistindo os benefícios na fase tardia da lesão, o que foi evidenciado pela melhora na velocidade de condução nervosa.

Outros estudos realizados por Byun et al. (2005) e Seo et al. (2006), que iniciaram o exercício em esteira ergométrica na fase precoce da lesão, 72 horas e 12 horas após o esmagamento nervoso, respectivamente, mostraram resultados positivos para recuperação funcional. Os autores consideraram que o exercício ativou as células de Schwann, que por sua vez, regularam a liberação

de BDNF (Byun et al., 2005) e proteína Cdc2 (Seo et al., 2006) na porção distal do nervo.

A opção por 30 minutos diários de exercício se justifica pelo tempo de intervenção comumente aplicado na clínica e considerando os estudos de Byun et al. (2005) e Seo et al. (2006), que demonstram que esse período foi suficiente para favorecer a regeneração axonal e assim promover melhor recuperação funcional após esmagamento nervoso.

O nível da água no tanque foi de 40 cm de profundidade para evitar que os animais se apoiassem no fundo ou às bordas do tanque.

Inicialmente, os ratos nadam energeticamente por 5 a 10 minutos e, em seguida, tendem a se manter em posição de flutuação, imóveis, permanecendo com a cabeça fora da água para descansar (Van Meeteren et al., 1997a). Além disso, Ness et al. (1975), citado por Cardoso (2004), relataram que após períodos de algumas semanas de exercício os ratos aprendem a mergulhar, realizando apnéia por alguns segundos no fundo do tanque e retornando à superfície para respirar. Para evitar tais artifícios, utilizou-se um bastão de madeira, a fim de evitar a acomodação e prevenir o estresse. A literatura relata estudos em que estímulos artificiais, como ameaça de afogamento, são utilizados para induzir o exercício constante. No entanto, esses estímulos estressam o animal, trazendo consequências negativas para a recuperação funcional após lesão (Gutmann e Jakoubek, 1963; Van Meeteren et al., 1997 a,b).

A intensidade do exercício é um parâmetro que deve ser destacado, visto que estudos que utilizam natação apresentam limitação quanto à determinação da intensidade do esforço executado pelo rato. Há poucos relatos na literatura referentes ao fluxo de lactato durante este tipo de exercício (Gobatto

et al., 2001; Manchado et al., 2006). O aumento dos níveis de lactato pode ser prejudicial por ocasionar o estresse e, conseqüentemente, reduzir a recuperação funcional por suprimir a regeneração nervosa e, além disso, aumentar a vulnerabilidade da lesão nervosa (Gutmann e Jakoubek, 1963; Amako e Nemoto, 1998; Van Meeteren et al., 1998; Tam e Gordon , 2003).

Optou-se neste estudo por não utilizar carga adicional ao corpo do animal durante o exercício, a fim de minimizar o estresse e não prejudicar a regeneração nervosa. Além disso, até o momento não há estudos que determinem a intensidade de exercício ideal para ratos desnervados.

Apesar de não terem sido realizadas medidas de nenhum marcador de exercício aeróbio, como por exemplo VO_2 máx/lactato, os animais se mantiveram em um nível de atividade que permitiu que eles nadassem por 30 minutos, sem sinais de desconforto.

6.5 REGENERAÇÃO AXONAL E MORFOMETRIA

Pouco se conhece sobre a influência de recursos terapêuticos como estimulação elétrica e natação no processo de regeneração nervosa. Considerando a necessidade de estudos que contribuam para a compreensão dos efeitos da intervenção fisioterapêutica, tanto no que se refere ao seu papel na preservação das condições do músculo desnervado, quanto no reparo do nervo lesado, este estudo fundamenta a utilização de tais recursos aplicados na fase aguda da axoniotmese.

O número de axônios regenerados no segmento nervoso distal à lesão foi sempre maior, quando comparado ao grupo controle, reforçando o fato de que cada axônio proximal emite 2 a 3 neuritos que crescem no interior dos tubos de

membrana basal das células de Schwann e avançam em direção ao músculo para o restabelecimento da conexão e da função (Fawcett e Keynes, 1990; Burnett e Zager, 2004).

Resultados semelhantes são apontados por Toft, Fugleholm e Schmalbruch (1988), após duas a quatro semanas do esmagamento do nervo isquiático de ratos. Observaram que no segmento nervoso proximal o número de fibras permanece o mesmo, enquanto no segmento distal à lesão encontraram 2 a 3 vezes mais axônios em relação ao segmento proximal, sendo 2% a mais de axônios mielínicos e 13% a mais de axônios amielínicos. Entre o 26° e o 60° dia após o esmagamento nervoso, o número de axônios tende a decrescer, refletindo o processo de eliminação sináptica, quando a fibra se torna monoinervada (Gorio et al., 1983).

O número médio de axônios observados no grupo controle (7477) coincide com os valores obtidos por Schmalbruch (1986) que observou, em nervo isquiático de animais da mesma espécie, uma média de 7469,25 axônios. Da mesma forma Santo Neto et al. (1998) observou uma média de 8012 axônios e Souza (2005), uma média de 7613,62 axônios.

Neste estudo, a aplicação de eletroestimulação e natação, bem como a associação de ambos durante a fase aguda da regeneração nervosa, não inibiu o brotamento axonal. Esses resultados contradizem os encontrados por outros autores, que afirmam que o aumento da atividade neuromuscular induzida por exercício de corrida em roda ou eletroestimulação crônica de músculos parcialmente desnervados durante 8 horas diárias, na fase aguda da regeneração, reduz o brotamento axonal pela inibição da formação de pontes entre células de Schwann perissinápticas, o que dificulta a reinervação. Assim,

sugerem que a atividade em nível moderado deve ser realizada, a fim de evitar os efeitos deletérios da desnervação (Tam et al., 2001; Love, Son e Thompson, 2003; Tam e Gordon, 2003).

A diferença entre os parâmetros de estimulação e de exercício aplicados neste estudo em relação aos citados anteriormente pode ser o motivo da divergência entre os resultados encontrados (Cheng e Lin, 2004). Nossos resultados sugerem que a EMFBF e o exercício de baixa intensidade, bem como associação entre ambos, podem ter regulado a expressão de fatores neurotróficos, como BDNF, NCAM, IGF-1, proteínas Cdc2, secretados pelos músculos desnervados e células de Schwann no nervo distal à lesão, os quais atuam como facilitadores do brotamento regenerativo (Ide, 1996; Byun et al., 2005; Monte-Raso et al., 2006; Seo et al., 2006). Entretanto, uma análise específica desses fatores necessita ser realizada.

Souza (2005), ao utilizar os mesmos parâmetros de eletroestimulação muscular fásica aplicados neste estudo, observou redução no número de axônios após 20 dias da lesão. Este achado parece estar relacionado com o número total de estímulos durante o tratamento, visto que o autor realizou EE por 20 dias, incluindo os finais de semana. O autor discute que a eletroestimulação pode ter acelerado a eliminação sináptica e que o microambiente de regeneração poderia estar comprometido pela diminuição da expressão de fatores neurotróficos e a depressão ou elevação excessiva nas reservas de cálcio poderiam prejudicar o papel do cone de crescimento no processo regenerativo, devido à quantidade de atividade muscular provocada pela EE.

No entanto, nenhuma das hipóteses reportadas naquele estudo poderia justificar os dados encontrados no grupo DNE neste estudo, que recebeu 1 hora

de intervenção ao dia, ainda assim havendo aumento do brotamento axonal. O mesmo ocorreu no grupo DE, que apresentou melhores resultados em relação ao grupo D no período de 22 dias.

Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Cheng e Lin (2004) que citam que a eletroestimulação muscular fásica aplicada durante 30 min/dia favoreceu o aumento da densidade da fibra nervosa e do número de axônios em nervos seccionados e reparados com tubos de silicone.

Outra hipótese que poderia justificar o número de axônios regenerados no grupo DE em relação ao grupo D é a utilização de corrente bifásica, que favorece o aumento do fluxo sanguíneo endoneural, normalização da temperatura e redução de edema (Woodcock, Taylor e Ewins, 1999), aumentando assim o aporte de substâncias tróficas ao nervo em regeneração – fato importante neste estudo – pois na axoniotmese a microcirculação local e o perineuro permanecem íntegros, o que favorece o processo de reparo nervoso (Lunn, Brown e Perry, 1990; Pachioni et al., 2006).

Mendonça, Barbieri e Mazzer (2003), apesar de utilizarem eletroestimulação muscular crônica de baixa frequência, confirmam que esta aumenta a densidade da fibra nervosa, por favorecer o brotamento e acelerar a regeneração da bainha de mielina após esmagamento. Concluíram que o aumento da regeneração nervosa se deve ao fato de a corrente elétrica aumentar o número e diâmetro dos vasa nervorum, o que acelerou a recuperação funcional.

Em relação à maturação axonal, os axônios regenerados em todos os grupos apresentaram menor calibre quando comparados ao grupo C. Trata-se de um fenômeno comum, que pode estar associado à privação de conexões terminais durante o processo de regeneração, à colagenização aumentada, à

retração endoneural e efeitos tardios da lesão sobre o corpo celular (Ansselin, Fink e Davey, 1997).

Os animais que realizaram apenas natação após a desnervação apresentaram maior recuperação do diâmetro dos axônios (68,70%) em relação àqueles desnervados e mantidos na gaiola (54,65%). Esses resultados sugerem que a natação possa ter proporcionado uma facilitação da musculatura distal comprometida, a partir da ativação dos músculos proximais, íntegros. Segundo Reichel (1998), quando se aplica um estímulo proprioceptivo a um membro que apresenta limitação funcional, os músculos “fracos” são facilitados pelos “fortes” através do mecanismo de irradiação, obtendo-se uma resposta automática de contração muscular.

Seo et al. (2006) relatam a importância da atividade precoce em esteira, apontando que nesse estágio a ativação do neurônio motor pode ser regulada, em parte, por *inputs* neuronais centrais, através do trato corticoespinal ou por vias aferentes motoras contralaterais do circuito locomotor na medula espinal. Concluem que essa ativação dos neurônios motores do membro contralateral pode aumentar a regeneração de axônios motores do membro lesado.

Considerando essa lógica, o exercício de natação realizado pelos animais desnervados neste estudo teria contribuído para a ativação dos neurônios motores que controlam os músculos contralaterais durante os primeiros 14 dias do exercício, facilitando a regeneração axonal no nervo lesado.

A literatura não apresenta relatos de análise morfométrica associada à análise funcional em ratos desnervados submetidos ao exercício de natação. O único estudo que se refere à morfometria no nervo isquiático de animais submetidos a desnervação e ao exercício de natação, foi desenvolvido por

Gutmann e Jakoubek (1963) que mostraram que a natação realizada durante 35 dias (3 ou 4x/dia por 60 minutos e intervalos de 90 minutos entre cada sessão) iniciada 24 horas após a lesão nervosa, retardou a maturação do nervo regenerado. Entretanto, não é possível comparar esses resultados com os resultados deste estudo, pois a lesão nervosa foi realizada bilateralmente.

Os valores da espessura da bainha de mielina nos grupos desnervados mostraram menor recuperação em relação aos valores controle. Há consenso de que a diminuição do calibre dos axônios nos nervos regenerados é acompanhada da diminuição da espessura da bainha de mielina (Ansselin, Fink e Davey, 1997; Ceballos et al., 1999; Verdú et al., 2000; Santo Neto et al., 2004). Fraher e Dockery (1998) afirmam que o axônio controla a espessura da bainha de mielina durante o desenvolvimento, sendo que um axônio de determinado calibre terá espessura proporcional a ele.

Santo Neto et al. (2004) constataram que aos 60 dias após secção e reparo por enxerto de nervo e músculo tratado com Cloridrato de lidocaína no nervo isquiático de ratos, os axônios regenerados não alcançaram os valores normais em relação ao diâmetro do axônio e da fibra nervosa, bem como da espessura da bainha de mielina. Schroder (1972) ressaltou que após lesões por compressão, o diâmetro dos axônios pode atingir valores controle após 6 meses, mas a espessura da bainha de mielina atinge apenas 79% do valor normal após 1 ano. Neste estudo, a recuperação da espessura da bainha de mielina foi de 62,82% no grupo D; 57,06% no grupo DE; 60,20% no grupo DN e 62,30% no grupo DNE, em relação aos valores controle.

Quanto ao diâmetro das fibras nervosas, Verdú et al. (2000) relatam que este atinge aproximadamente 75% dos valores controle após a lesão,

difícilmente alcançando valores normais. Nesse estudo, observou-se que o diâmetro médio das fibras recuperou 57,68% no grupo D; 57,72% no grupo DE; 65,59% no grupo DN e 63,45% no grupo DNE, em relação aos valores controle. No entanto, apesar de nenhum dos grupos desnervados atingirem os níveis de maturação do grupo controle, vale ressaltar que esse resultado corresponde à análise realizada somente aos 22 dias após a lesão. Possivelmente, uma avaliação em tempos mais prolongados poderia refletir um estágio mais avançado de maturação, uma vez que a mielinização do axônio regenerado é processual e ocorre em várias semanas ou meses (Ceballos et al., 1999; Verdú et al., 2000).

O diâmetro médio das fibras nervosas do grupo controle neste estudo apresentou valores semelhantes aos apontados na literatura, ou seja, entre 9 e 12 μ m (Lenihan et al., 1998b; Teodori, 2000; Souza, 2005), bem como o diâmetro médio dos axônios, entre 5 e 7 μ m (Teodori, 2000; Souza, 2005) e a espessura da bainha de mielina, entre 1 e 2 μ m (Santo Neto et al., 2004; Souza, 2005).

A Razão G é um parâmetro que reflete a proporção entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da fibra, e está relacionado à velocidade de condução do impulso nervoso, refletindo a maturação das fibras regeneradas (Ansselin, Fink e Davey, 1997). Waxman e Bennett (1972) citam que valores de razão G entre 0,5 e 0,7 indicam uma velocidade de condução normal. Para Ansselin, Fink e Davey (1997) os valores de normalidade encontram-se entre 0,6 e 0,7. Valores G inferiores a 0,6 indicam densa mielinização do axônio, enquanto valores G superiores a 0,7 indicam fraca mielinização do axônio.

Os dados de razão G obtidos neste estudo para todos os grupos refletem a maturação normal das fibras regeneradas, sugerindo que a velocidade

de condução nervosa teria sido recuperada, não sendo influenciada por nenhum dos protocolos de intervenção aplicados.

Como somente a variável diâmetro do axônio do grupo DN foi diferente quando comparada ao grupo D, não se pode afirmar que o protocolo de natação proporcionou maior benefício que o de eletroestimulação ou a associação de ambos para a maturação das fibras regeneradas. Verificou-se assim, que os protocolos de intervenção aplicados neste trabalho na fase aguda da lesão não influenciaram no processo de maturação das fibras regeneradas. Entretanto, alguns autores reportam a importância da estimulação precoce, ou seja, a atividade iniciada na fase aguda da lesão, por oferecer benefícios ao músculo desnervado, como aumento da resistência à fadiga, restauração das propriedades contráteis e da mecanossensibilidade (Marqueste et al., 2004), além de minimizar a atrofia e proliferação de tecido conjuntivo (Fernandes et al., 2005; Tanaka, Tsubaki e Tachino, 2005; Rocha, 2006), promovendo a recuperação funcional (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974, 1980a, b; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006).

Devido à ausência de dados morfométricos na literatura referente à regeneração de nervos periféricos de ratos desnervados submetidos à natação e a eletroestimulação, bem como à associação entre ambos, não foi possível comparar nossos resultados com outros estudos.

6.6 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA

O método de avaliação da marcha por meio do IFC utilizado neste estudo foi o proposto por De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982) e aprimorado por Bain, Mackinnon e Hunter (1989), que permite uma avaliação global e quantitativa da condição funcional do nervo isquiático de ratos após lesão nervosa periférica.

Este método apresenta vantagens em relação a outros (eletrofisiológicos e histomorfométricos), pois além de não ser invasivo e ser facilmente reproduzível, apresenta baixo custo, proporciona integração entre o sistema sensorial e o motor (Kanaya, Firrell e Breidenbach, 1996; Oliveira et al., 2001), sendo confiável para avaliar o processo de regeneração nervosa (Varejão et al., 2004; Martins et al., 2006).

O material utilizado para a avaliação do IFC, como a tinta de impressão digital e o papel sulfite, apresentam menor risco da presença de “sombras” nas pegadas impressas (difusão radial), o que freqüentemente é observado quando se utiliza um agente revelador. Além disso, torna mais fácil e fidedigna a leitura das pegadas, o custo é inferior e há menor risco de toxicidade para o animal, quando comparado com o uso da película radiográfica e o líquido revelador (Varejão et al., 2001, 2003, 2004).

Utilizando índices funcionais, Hare et al. (1992) observaram que o grau de recuperação funcional variava de acordo com o tipo de nervo envolvido e com o grau de lesão. Verificaram recuperação de 41% da função após secção do nervo isquiático, 54% após secção do tibial e 100% após secção do fibular. Destacam que após compressão, a recuperação é completa. Schmalbruch (1986) sugere que esta variabilidade na recuperação se deve à quantidade de fibras mistas que cada nervo possui, sendo que quanto maior o seu número maior pode ser o potencial para formação de conexões inapropriadas durante a reinervação.

Varejão et al. (2001) relataram que após lesão, as fibras nervosas inervam músculos de forma não seletiva, refletindo na ativação de padrões musculares anormais durante a locomoção e que, embora o músculo ou receptor sensorial seja reinervado, o controle cortical pode não permitir uma ativação

muscular adequada. No entanto, devido as constantes modificações dos mapas corticais, no caso do registro da marcha, a reprogramação do cérebro dos ratos pode explicar a melhora no IFC ao longo do tempo.

Observou-se neste estudo que os valores do IFC dos grupos experimentais apresentaram desvio padrão alto, porém, esses valores foram semelhantes entre os grupos e nos diferentes períodos de análise, o que sugere que esta variação esteja relacionada às características individuais de cada animal.

Neste estudo a avaliação do IFC mostrou o mesmo padrão funcional intergrupos ao longo do tempo. No período pré-operatório os animais apresentaram IFC entre 0 e $\sim 15\%$, apontando para uma função normal, por manter-se dentro da faixa de normalidade indicada por Dash et al. (1996) que consideram que os valores de IFC em ratos com função normal devem estar aproximadamente entre $0 \pm 20\%$, bem como, após a lesão estes valores tornam-se mais negativos, estando entre ~ 21 a ~ 100 , o que indica uma completa disfunção. Esse comportamento do IFC no grupo desnervado foi observado também neste estudo, pois entre o 7° e o 14° dia PO os valores do IFC refletiram uma função deteriorada, caracterizando ausência de inervação nesse período.

Entretanto, a partir do 14° dia PO foi observado aumento dos valores do IFC, com retorno gradual da função, indicando o início do processo de reinervação muscular. No 21° dia PO nota-se que estes valores atingiram níveis próximos de zero, caracterizando recuperação funcional. Todavia, ao analisar graficamente a evolução das curvas, nota-se que os valores médios entre os grupos em cada tempo são heterogêneos, porém sem diferença significativa. Estudos demonstraram que este processo de recuperação pode ser esperado

após desnervação, pois aos 10 dias da lesão nenhum axônio é evidenciado no músculo e a reinervação muscular tem início duas semanas após axoniotmese em ratos, quando 25% das fibras musculares estão poliinervadas, sendo que entre o 21º e o 25º dia ocorre o pico de poliinervação e a atividade mecânica do músculo encontra-se parcialmente recuperada (Carmignoto et al., 1983; Gorio et al., 1983).

Nossos achados estão de acordo com o estudo De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982), que também observaram que a recuperação funcional ocorria entre 16º ao 25º dia após esmagamento, com valores de IFC próximos de zero.

Van Meeteren et al. (1997c) relataram que no 4º dia após esmagamento, a função motora é perdida em até 80%, o que indica a eficácia do modelo de lesão, seguindo-se por uma restauração gradual da mesma durante a regeneração do nervo.

Dash et al. (1996) citam o IFC como importante indicador para analisar a recuperação funcional de lesões nervosas de curta duração (5 segundos de compressão), pois permitiu identificar uma diminuição da função na primeira semana e um retorno gradual a partir da terceira semana, refletindo condição funcional compatível com a de nervos normais.

Apesar da evolução semelhante entre os grupos durante os diferentes períodos de avaliação, há relatos de que a atividade iniciada na fase imediata da lesão é capaz de minimizar a atrofia (Marqueste et al., 2004; Fernandes et al., 2005; Tanaka, Tsubaki e Tachino, 2005), estimulando a atividade funcional após reinervação (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974, 1980a,b). Por este motivo reforça-se novamente a importância da estimulação precoce, uma vez que esta não prejudicou a regeneração nervosa e nem a recuperação funcional.

Ao considerar esses relatos, nota-se a importância dos parâmetros empregados, assim como a duração de cada protocolo, como fatores relevantes para alterar as respostas do sistema nervoso periférico.

Quando foi realizada uma análise intragrupos, observou-se diferença significativa entre os tempos de análise. O valor médio do grupo DNE aos 21 dias PO (21,44) não atingiu valores controle (0 ± 20), diferindo do pré-operatório, o que sugere que a associação dos tratamentos tenha promovido uma atividade muscular extenuante, prejudicando a recuperação da função, uma vez que os dados referentes à maturação das fibras nervosas não mostraram comprometimento da mesma.

Uma hipótese que poderia justificar algum dano muscular neste grupo seria a depleção do conteúdo de glicogênio muscular, decorrente da maior atividade a que este grupo foi submetido. O conteúdo de glicogênio muscular reflete a condição nutricional da fibra muscular. Uma depleção nas reservas de glicogênio muscular leva a um desequilíbrio na homeostasia energética, ocasionando o desenvolvimento de fadiga e conseqüente comprometimento da atividade contrátil (Shulman e Rothman, 2001).

Silva et al. (1999) relataram que a depleção das reservas de glicogênio relaciona-se diretamente ao processo de exaustão, fato que pode ser complementado por Jones e Carter (2000), que demonstraram que a produção de lactato em excesso pode prejudicar as propriedades contráteis do músculo, por interferir na condutibilidade elétrica da membrana e na atividade metabólica, o que diminui o desempenho e contribui para fadiga.

Considerando que a homeostasia energética do tecido muscular depende de inúmeros fatores, como a integridade da junção neuromuscular, o

estado funcional das fibras musculares, a sensibilidade à insulina e o suprimento adequado de substratos metabolizáveis (Cancelliero, Costa e Silva, 2006) seria interessante uma análise muscular de tais fatores.

Deste modo, sugere-se que o comprometimento da função poderia estar relacionado com a duração da atividade realizada pelo grupo DNE, pois se a intervenção terapêutica não foi capaz de manter o perfil metabólico do músculo desnervado adequadamente, a sua funcionalidade poderá ser prejudicada durante o curso da reinervação, visto que a dinâmica contrátil depende da integridade funcional das placas motoras e dos processos de captação de substratos energéticos (Silva et al., 1999).

Van Meeteren et al. (1998) apontaram que a recuperação funcional pode ser retardada em consequência da severidade do treinamento e do estresse causado pelo exercício intenso em animais desnervados.

Considerando que nos demais grupos não se observou diferença do 21º dia PO com os seus respectivos valores pré-operatórios, verificou-se que nesse período cada grupo alcançou valores compatíveis com o de nervos normais para uma função adequada. Constatou-se, na última semana de análise, recuperação de 51% no grupo D, 40% no grupo DN e 67,5 % no grupo DE, em relação ao 7º dia PO.

Mendonça, Barbieri e Mazzer (2003) observaram que o IFC ao longo do tempo em animais desnervados, seguidos ou não de eletroestimulação, apontou uma tendência gradual de recuperação funcional, havendo boa recuperação no decorrer das avaliações. O mesmo foi observado por Varejão et al. (2001, 2003, 2004), Byun et al. (2005) e Seo et al. (2006) após compressão do nervo isquiático de ratos e mobilização.

Quando se comparou os registros das pegadas do pré-operatório com o 7º dia PO, constatou-se que os animais realizavam compensação com a pata contralateral durante a marcha. Entretanto, esse comportamento não alterou significativamente os dados do IFC. O mesmo resultado foi relatado por Hare et al. (1992) e Varejão et al. (2004), que concluíram não haver diferença significativa na impressão da pata normal e, portanto, esta provê uma função normal sendo possível comparar com a pata afetada.

O aumento do parâmetro PL e da flexão plantar e diminuição do TS e ITS observados na pata comprometida em nosso estudo no 7º dia PO, são alterações comuns encontradas na primeira semana de lesão (Bain, Mackinnon e Hunter, 1989), quando os animais apresentam como características pés caídos e adução completa dos dedos, respectivamente, o que demonstra a disfunção do nervo isquiático (Monte-Raso, Barbieri e Mazzer, 2006). Esse resultado reforça a eficácia do protocolo de esmagamento do nervo realizado neste estudo.

A partir da segunda semana após a lesão os animais recuperam gradualmente a capacidade de apoio completo sobre o membro e a abdução dos dedos (Monte-Raso, Barbieri e Mazzer, 2006), fato observado em nosso estudo quando, ao comparar os registros das pegadas do pré-operatório com o 21º dia PO, constatou-se uma semelhança entre as pegadas nestes diferentes períodos de avaliação, mostrando bom grau de recuperação funcional.

Neste estudo não se observou contratura em flexão, provavelmente devido à mobilização constante do membro desnervado durante o exercício e eletroestimulação, bem como na associação de ambos, o que pode influenciar positivamente na fase de regeneração (Van Meeteren et al., 1997a; Varejão et al., 2004, Meek et al., 2004). Além disso, o tipo de lesão (axoniotmese) permite

regeneração espontânea e rápida reinervação muscular (Lee e Wolfe, 2000; Martins et al., 2006).

Recuperação funcional satisfatória também foi observada por outros autores que utilizaram o IFC, após 2 a 4 semanas da desnervação (De Medinaceli, Freed e Wyatt, 1982; Hare et al., 1992; Dash et al., 1996; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006; Monte-Raso et al., 2006).

Os resultados obtidos pela avaliação do IFC indicam que a funcionalidade do membro posterior de ratos 21 dias após o esmagamento do nervo isquiático é alcançada, independentemente da realização de eletroestimulação, exercício de natação, ou associação de ambos, na fase aguda da lesão.

6.7 CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS E O IFC

A regeneração nervosa tem sido quantificada experimentalmente por métodos eletrofisiológicos, histomorfométricos e testes funcionais (Munro et al., 1998; Varejão et al., 2001, 2004; Monte-Raso et al., 2006). Entretanto, na literatura há controvérsias sobre a correlação entre a recuperação morfológica do nervo e a funcional (Dash et al., 1996; Kanaya, Firrell e Breidenbach, 1996; Oliveira et al., 2001; Mendonça, Barbieri e Mazzer, 2003; Wolthers et al., 2005).

Em todos os grupos experimentais algumas variáveis morfométricas apresentaram correlações lineares fortes entre si e esses resultados corroboram o que foi apontado na literatura após lesão nervosa periférica (Kanaya, Firrell e Breidenbach, 1996; Munro et al., 1998; Wolthers et al., 2005; Martins et al., 2006).

Outra constatação quando se compara os diferentes grupos é a correlação entre o IFC no período pré-operatório e o diâmetro do axônio no grupo

C, bem como, o IFC no 21º dia PO e a razão G nos grupos D e DN. Apesar disso, as demais variáveis relacionadas à maturação do nervo regenerado, como o diâmetro da fibra nervosa e espessura da bainha de mielina, não apresentaram correlação com o IFC, o que não permitiu neste estudo, constatar a presença de correlação com a recuperação funcional. Kanaya, Firrell e Breidenbach (1996) também consideraram insuficiente a correlação encontrada somente entre Razão G e o IFC, pois a Razão G, apesar de estar relacionada à velocidade de condução, que por sua vez depende de adequada condição de mielinização, não contempla os aspectos pertinentes à integração entre o sistema nervoso central e periférico, assim como deste com o órgão-alvo.

Martins et al. (2006), após secção e reparo do nervo isquiático, encontraram apenas correlações do IFC com o diâmetro proximal das fibras e do IFC com o diâmetro distal das fibras. Concluíram que cada método avalia diferentes estágios da regeneração e, portanto, a correlação entre os métodos é pouco freqüente.

Dash et al. (1996) consideraram que a falta de correlação entre os métodos se deve ao fato de que o processo de mielinização ocorre em período diferente do processo de recuperação funcional.

Desta forma, considera-se que neste estudo não houve correlação entre dados morfométricos e funcionais, ratificando as observações de outros autores (Munro et al., 1998; Varejão et al., 2001, 2004; Wolthers et al., 2005).

Possivelmente, a ausência de correlação entre os dados morfométricos e funcionais se deve ao fato de que a maturação dos axônios regenerados é processual, sendo que no rato, após esmagamento do nervo isquiático, a reorganização do contato nervo-músculos da pata posterior ocorre

aproximadamente aos 90 dias (Carmignoto et al., 1983). A análise realizada 22 dias após a lesão possibilitou observar que houve recuperação da funcionalidade, entretanto, nessa fase da regeneração o diâmetro dos axônios e das fibras nervosas não atingiram os valores de normalidade. Há relatos de que esses valores alcançam até 75% dos valores controle após vários meses da lesão (Verdú et al., 2000). Essa diferença de ritmo entre a recuperação morfológica e funcional poderia explicar a ausência de correlação.

Kanaya, Firrell e Breidenbach (1996) apontam duas hipóteses para ausência de correlação entre o IFC e os outros métodos de avaliação, entre elas: 1- o IFC mensura a função total do nervo e todos os outros parâmetros não; 2- alguns parâmetros são melhores mensurados e não se correlacionam com nenhum outro. Assim essa falta de correlação, indica que cada parâmetro mede diferentes aspectos da regeneração do nervo.

Por outro lado, Oliveira et al. (2001) citam que o IFC reflete a recuperação funcional temporal do nervo isquiático de ratos e, dependendo do grau de lesão, a melhora pode ser completa ou limitada, o que reflete o aumento ou diminuição do número de axônios regenerados e a qualidade da regeneração das fibras nervosas. Consideram que a função correlaciona-se diretamente com o grau de regeneração morfológica, entretanto, utilizam o termo correlação sem aplicar análise estatística de correlação em seu estudo.

É importante destacar ainda, o comportamento distinto do grupo DNE na análise funcional da marcha, em que a função não recuperou valores controle aos 21 dias após a lesão. A ausência de correlação do IFC com os dados morfométricos nesse grupo reafirma que, possivelmente a causa dessa limitação na recuperação funcional foi o dano muscular, entre eles, a fadiga muscular

promovida pela associação dos tratamentos, que somavam 1 hora de intervenção diária.

Devido à inexistência de dados na literatura abordando a correlação de resultados morfométricos e funcionais em nervos regenerados de ratos submetidos a procedimentos fisioterapêuticos, não foi possível a comparação destes resultados com outros trabalhos.

Nesse contexto, cabe salientar a importância dos resultados de pesquisas que reproduzem as condições clínicas e a necessidade de utilização de vários métodos de avaliação a fim de fornecer subsídios consistentes para sustentar a conclusão deste estudo.

7 CONCLUSÕES

Considerando o modelo experimental utilizado neste estudo, conclui-se que os protocolos de natação livre e estimulação elétrica muscular fásica de baixa frequência aplicados na fase aguda da lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos não influenciaram o grau de maturação das fibras nervosas regeneradas, nem a funcionalidade dos músculos reinervados.

O protocolo de eletroestimulação, aplicado isoladamente, favoreceu o brotamento axonal em animais desnervados.

Considerando que tanto o exercício de natação livre quanto a eletroestimulação muscular aplicados isoladamente não causaram danos à recuperação funcional, ambos tratamentos poderiam ser indicados após lesão nervosa periférica, visando contribuir para a recuperação do músculo desnervado.

A associação do exercício de natação e eletroestimulação não afetou a regeneração nervosa, mas sinalizou prejuízo à recuperação funcional, sugerindo que pode ter se caracterizado uma sobrecarga aos músculos em fase de reinervação.

Independentemente da realização dos protocolos de intervenção, não se observou correlação entre a morfologia do nervo e o Índice Funcional do Ciático em ratos submetidos à axoniotmese, possivelmente devido à diferença de ritmos entre a recuperação da estrutura do nervo e de sua função.

Sugere-se a realização de futuros estudos para investigar os efeitos destes protocolos de intervenção em diferentes períodos da desnervação e verificar fatores que possam ter influenciado as respostas do sistema nervoso.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando as hipóteses levantadas nesse estudo, futuras investigações são necessárias para elucidar os aspectos relacionados aos resultados obtidos, entre elas:

- Aos 22 dias, os protocolos de intervenção não influenciaram na maturação da fibra nervosa. A análise dos aspectos morfológicos das junções neuromusculares neste mesmo período poderia demonstrar a influência dos protocolos de intervenção sobre a estrutura do terminal nervoso e receptores de acetilcolina, bem como sobre o brotamento terminal e possível eliminação sináptica.
- Uma mensuração específica da velocidade de condução do impulso nervoso, representando o comportamento dos potenciais de ação do músculo através de um estudo eletrofisiológico, pois apesar dos resultados de Razão G sinalizarem que a velocidade de condução teria sido recuperada, isso não pôde ser constatado diretamente neste estudo.
- Observando as características histológicas do nervo isquiático nos diferentes grupos estudados, onde se observa grande quantidade de macrófagos, seria possível associar a influência dos protocolos de intervenção empregados sobre a vascularização do nervo em regeneração, utilizando-se do ultra-som Doppler, além da quantificação dos macrófagos.
- Diante dos resultados obtidos da avaliação funcional, uma análise histomorfométrica do músculo, bem como análise da expressão de genes específicos poderia complementar as conclusões deste estudo.
- Quanto ao protocolo de natação, seria possível quantificar o nível de atividade dos animais após desnervação, através da mensuração do deslocamento

percorrido durante a sessão. Além disso, a determinação do limiar de anaerobiose em animais desnervados poderia ser realizada através da análise da concentração de lactato sanguíneo, visto que este poderia determinar a intensidade do exercício após desnervação e o lactato em alta concentração pode influenciar na regeneração nervosa e, conseqüentemente, na recuperação funcional.

REFERÊNCIAS *

Al-Majed AA, Neumann CM, Brushart TM, Gordon T. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *Eur J Neurosci.* 2000; 20 (7): 2602-08.

Amako M, Nemoto K. Influence of water immersion stress on peripheral nerve recovery in the rat. *J. Orthop. Sci.* 1998; 3:32-41.

Anselin AD, Fink T, Davey DF. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with Schwann cells. *Neurophatol. and Applied Neurobiol.* 1997; 23: 387-98.

Ashley Z, Sutherland H, Lanmuller H, Unger E, Li F, Mayr W et al. Determination of the Chronaxie and Rheobase of Denervated Limb Muscles in Conscious Rabbits. *Artif Organs.* 2005; 29(3): 212-15.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter RT. Functional Evaluation of complete sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83 (1): 129-38.

Bain JR, Veltri KL, Chamberlain D, Fahnestock M. Improved functional recovery of denervated skeletal muscle after temporary sensory nerve innervation. *Neuroscience.* 2001; 103(2): 503-10.

Beer GM, Steurer J, Meyer VE. Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17: 531-4. Apud Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Qualitative and quantitative evaluation of rats acute injuries caused by Sciatic nerve smashing. *Acta Ortop Bras.* 2006; 14(4): 220-25.

Bennie SD, Petrofsky JS, Nisperos J, Tsurudome M, Laymon M. Toward the optimal waveform for electrical stimulation of human muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2002; 88: 13-9.

Bishop B. Neural Plasticity Part 3: Responses to lesions in the peripheral nervous system. *Phys Ther.* 1982; 12(9): 1275- 82.

Bolfe VJ. Estudo da Impedância Elétrica dos Eletrodos de Silicone-Carbono, Agentes de Acoplamento e Tecidos Biológicos [Dissertação de Mestrado]. 111p. Piracicaba: UNIMEP; 2007.

Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA et al. Nerve crush injuries - A model for axonotmesis. *Exp Neurol.* 1994; 127 (2): 284-90.

* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Brushart TM, Hoffman PN, Royall RM, Murinson BB, Witzel C, Gordon T. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci*. 2002; 22 (15): 6631-38.

Brushart TM, Jari R, Verge V, Rohde C, Gordon T. Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration. *Exp Neurol*. 2005; 194: 221-29.

Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of Peripheral Nerve Injury: A Brief Review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(5): article 1-7.

Byun YH, Lee MH, Kim SS, Kim H, Chang HK, Lee TH et al. Treadmill running promotes functional recovery and decreases brain-derived neurotrophic factor mRNA expression following sciatic crushed nerve injury in rats. *J sports Med Phys Fitness*. 2005; 45 (2): 222-28.

Cancelliero KM, Costa D, Silva CA. Estimulação diafragmática elétrica transcutânea melhora as condições metabólicas dos músculos respiratórios de ratos. *Rev. Bras. Fisioter*. 2006; 10 (1): 59-65.

Cardoso AL. Incidência dos tipos de fibras no músculo diafragma após treinamento e destreinamento físico [Dissertação de Mestrado]. 52p. Piracicaba: UNIMEP; 2004.

Carlton JM, Goldberg NH. Quantitating integrated muscle function following reinnervation. *Surg Forum*. 1986; 37: 611-12.

Carmignoto G, Finesso M, Siliprandi R, Gorio A. Muscle reinnervation – I. Restoration of transmitter release mechanisms. *Neuroscience*. 1983; 8(3): 393-401.

Carter AJ, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. *J Hand Surg [Br]*. 1998; 23(3): 365-9.

Carvalho CMM. Efeitos da Imobilização e do Exercício Físico em Algumas Propriedades Mecânicas do Músculo Esquelético [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: EESC/FMRP/IQSC – Universidade de São Paulo; 2001.

Ceballos D, Cuadras J, Verdú E, Navarro X. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J. Anat*. 1999; 195: 563-76.

Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral Regeneration. *Annu. Neurosci. Rev*. 2007; 30: 209-33.

Cheng WL, Lin CK. The effects of different electrical stimulation protocols on nerve regeneration through silicone conduits. *The Journal of Trauma: Injury, Infection and critical care*. 2004; 56 (6): 1241-46.

Ciabattari O, Dal Pai A, Dal Pai V. Efeito da natação associado a diferentes dietas sobre o músculo tibial anterior do rato: estudo morfológico e histoquímico. *Rev Bras Med Esporte*. 2005; 11 (2): 121-25.

Cole BG, Gardiner PF. Does electrical stimulation of denervated muscle, continued after reinnervation, influence recovery of contractile function? *Exp Neurol*. 1984; 85(1): 52-62.

Daneyemez M, Solmaz I, Izci Y. Prognostic factors for the surgical management of peripheral nerve lesions. *Tohoku J Exp Med*. 2005; 205(3): 269-75.

Dash H, Kononov A, Prayson RA, Petras S, Browne EZ. Evaluation of nerve recovery from minimal-duration crush injury. *Ann Plast Surg*. 1996; 37: 526-31.

Decherchi P, Dousset E, Marqueste T, Berthelin F, Hug F, Jammes Y, Grélot L. Électromyostimulation et recuperation fonctionnelle d'un muscle dénervé [abstract]. *Science & Sports*. 2003; 18(5): 253-63.

Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery*. 1989; 10 (3): 220-5.

De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the function condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982; 77: 634-43.

Deschenes MR, Maresh CM, Kraimer WJ. Exercise Training of Moderate Intensity Does not abate the effects of denervation on muscle morphology. *Int. J. Sports Med*. 1997; 18 (6): 426-30.

Deschenes MR, Tenny KA, Wilson MH. Increased and Decreased Activity Elicits Specific Morphological Adaptations of the Neuromuscular Junction. *Neuroscience*. 2006; 137: 1277-83.

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.

Dow DE, Faulkner JA, Dennis RG. Distribution of Rest Periods Between Electrically Generated Contractions in Denervated Muscles of Rats. *Artif Organs*. 2005; 29(6): 432-35.

Dubový P. Schwann cells and endoneurial extracellular matrix molecules as potential cues for sorting of regenerated axons: A review. *Anat Sci International*. 2004; 79: 198-208.

Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med. Sci. Sports Exerc*. 1996; 28 (12): 1463-69.

Eberstein A, Pachter BR. The effect of electrical stimulation on reinnervation of rat muscle: contractile properties and endplate morphometry. *Brain Res.* 1986; 384(2): 304-10.

Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology*. 2. ed. Philadelphia: McGRAW-HILL INC; 1994. 1960p.

Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec.* 2001; 263(4): 396-404.

Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras [serial online]* 2004; 19(1): 59-65. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 1990; 13: 43-60.

Fernandes KCBG, Polacow MLO, Guirro RRJ, Campos GER, Somazz MC, Pinto VF, et al. Análise Morfométrica dos Tecidos Muscular e Conjuntivo Após Desnervação e Estimulação Elétrica de Baixa Frequência. *Rev Bras Fisiot.* 2005; 9 (2): 235-41.

Ferreira AS. *Lesões Nervosas Periféricas: Diagnóstico e Tratamento*. 2.ed. São Paulo: Editora Santos; 2001.

Fraher J, Dockery P. A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. *J Anat.* 1998; 193 (2): 195-201.

Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem. Physiol.* 2001; 130: 21-7.

Gordon T, Sulaiman O, Boyd G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 2003; 8:236-50.

Gorio A, Carmignoto G, Finesso M, Polato P, Nunzi MG. Muscle reinnervation-II Sprouting, synapse formation and repression. *Neurosci, [S.L.]*. 1983; 8 (3): 403-16.

Gouveia Jr. A, Morato S. Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. *Interação em Psicologia.* 2002; 6(2): 140-7.

Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and Surgical Management of Peripheral Nerve Problems. *Neurosurgery.* 1999; 44(4): 825-39.

Guiro E, Guirro RRJ. *Fisioterapia Dermato Funcional: fundamentos, recursos e patologias*. 3.ed. São Paulo: Manole; 2002. 560p.

Guirro RRJ, Silva CA, Forti F, Cancelliero KM. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisiot.* 2004; 8: 21-7.

Gutmann E. Factors affecting recovery of motor function after nerve lesions. *J Neurol Psychiatr.* 1942; 5: 81- 95. Apud De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the function condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77: 634-43.

Gutmann E, Jakoubek B. Effect of increased motor activity on regeneration of the peripheral nerve in young rats. *Physiol Bohemoslov.* 1963; 12 (5): 463-68.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP et al. Walking track analysis: A long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg* 1992; 89: 251–58.

Harri M, Kuusela P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? *Acta Physiol Scand.* 1986; 126: 189-127.

Hennig R. Late reinnervation of the rat soleus muscle is differentially suppressed by chronic stimulation and by ectopic innervation. *Acta Physiol Scand.* 1987; 130(1): 156-60.

Herbison GJ, Gordon EE. Exercise of normal muscle: biochemical effects. *Arch Phys Med Rehabil.* 1973; 54 (9): 409-15.

Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF. Effects of swimming on reinnervation of rat skeletal muscle. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1974; 37 (11):1247-51.

Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF. Effect of activity and inactivity on reinnervating rat skeletal muscle contractility. *Exp Neurol.* 1980b; 70 (3): 498-506.

Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF. Histochemical fiber type alterations secondary to exercise training of reinnervating adult rat muscle. *Arch Phys Med Rehabil.* 1980a; 61(6): 225-57.

Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno, JF. Reinnervating rat skeletal muscle: 35% grade treadmill exercise. *Arch Phys Med Rehabil.* 1982; 63 (7): 313-8.

Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996; 25: 101-21.

Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury, Int. J. Care Injured.* 2005; 36 Suppl 4: S24-29.

Jones AM, Carter H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. *Sports Medicine.* 2000; 29: 373-76.

Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopy study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br.* 1990; 72(2): 293-7.

Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98 (7):1264–71.

Kanaya F, Tajima T. Effect of electrostimulation on denervated muscle. *Clin Orthop Relat Res.* 1992; (283):296-301.

Karnovsky MJ. A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1965; 27: 137a.

Kern H, Hofer C, Modlin M, Forstner C, Raschka-Hogler D, Mayr W, Stohr H. Denervated muscles in humans: limitations and problems of currently used functional electrical stimulation training protocols. *Artif Organs.* 2002; 26(3): 216-8.

Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 2000; 8: 243-52.

Lenihan DV, Carter AJ, Gilchrist T, Healy DM, Miller IA, Myles LM, Glasby MA. Biodegradable controlled release glass in the repair of peripheral nerve injuries. *J Hand Surg [Br].* 1998b; 23(5):588-93.

Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation.* 2. ed. San Diego: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. 369p.

Lömo T, Westgaard RH, Dahl HA. Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. *Proc R Soc Lond B. Biol. Sci.* 1974; 187 (1086): 99-103.

Love FM, Son YJ, Thompson WJ. Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J Neurobiol.* 2003; 54: 566–76.

Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopy study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec.* 1997; 248(3): 335-65.

Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand.* 1987; 58(2):145-69.

Lundy-Ekman L. *Neurociência: Fundamentos para a reabilitação.* 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. 231p.

Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neurosci.* 1990; 35 (1):157-65.

Lutz BS, Wei FC, Ma SF, Chuang DCC. Effects of insulin-like growth factor-1 in motor nerve regeneration after nerve transection and repair vs. nerve crushing injury in the rat. *Acta Neurochir.* 1999; 141: 1101-06.

Machado ABM. *Neuroanatomia Funcional.* 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2000. 102-03 p.

Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MAR. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Rev Bras Med Esporte.* 2006; 12 (5): 259-62.

Marqueste T, Alliez JR, Alluin O, Jammes Y, Decherchi P. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. *J Appl Physiol.* 2004; 96(5):1988-95.

Marqueste T, Decherchi P, Desplanches D, Favier R, Grelot L, Jmmes Y. Chronic electrostimulation after nerve repair by self-anastomosis: effects on the size, the mechanical, histochemical and biochemical muscle properties [abstract]. *Acta Neuropathol.* 2006; 111(6): 589-600.

Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Plese JPP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2006; 64 (3-B): 750-56.

Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Qualitative and quantitative evaluation of rats acute injuries caused by Sciatic nerve smashing. *Acta Ortop Bras.* 2006; 14(4): 220-25.

Meek MF, Koning MAJ, Nicolai J-PA, Gramsbergen A. Rehabilitation strategy using enhanced housing environment during neural regeneration. *J Neurosci Methods.* 2004; 136: 179-85.

Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Methods.* 2003; 129: 183-90.

Mira, JC. Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regenerating fibres after repeated localized freezings [abstract]. *J Anat.* 1979; 129 (Pt1): 77-93.

Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Twiss JL. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Neurosci.* 2004; 101(22): 8473-78.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: Análise funcional da marcha. *Rev. Bras. Fisioter.* 2006; 10 (1): 113-19.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N. Sciatic Functional Index in Smashing Injuries of Rats' Sciatic Nerves. Evaluation of Method Reproducibility Among Examiners. *Acta Ortop Bras*. 2006; 14(3): 133-36.

Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle & Nerve*. 1998; 21: 1095-97.

Nakao C, Ookawara T, Kizaki T, Oh-Ishi S, Miyazaki H, Haga S et al. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J Appl Physiol*. 2000; 88: 649-54.

Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. *Eletroterapia clínica*. 3. ed. São Paulo: Manole; 2003. 578 p.

Ness GW, Gardiner PF, Secord DC, Taylor AW. The effects of swimming and running regimens on skeletal muscle glycogen in the rat. *Rev Can Biol*. 1975; 34(1-2): 45-50. Apud Cardoso AL. Incidência dos tipos de fibras no músculo diafragma após treinamento e destreinamento físico [Dissertação de Mestrado]. 52p. Piracicaba: UNIMEP; 2004.

Nix WA, Hopf HC. Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. *Brain Res*. 1983; 272(1): 21-5.

Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17(1): 69-75.

Oliveira CA, Suchecki D, Cohen S, D'Almeida V. Acute stressor-selective effect on total plasma homocysteine concentration in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2004; 77:269-73.

Omura T, Sano M, Omura K, Hasawa T, Doi M, Sawada T, Nagano A. Different expressions of BDNF, NT3, and NT4 in muscle and nerve after various types of peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst*. 2005; 10: 293-300.

Pachioni CAS, Mazzer N, Barbieri CH, Fazan VPS, Padovani CR, Moro CA, Silva CAA. Lesão por Esmagamento do Nervo Isquiático de Ratos: Estudo da Vascularização. *Acta Ortop. Bras*. 2006; 14(4): 203-07.

Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol*. 2001; 115(5): 359-72.

Pette D, Vrbová G. Invited review: What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve*. 1999; 22(6): 666-77.

Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ, Campos MR, Borges JP. Estudo morfológico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. *Rev Bras Fisiot*. 2003; 7(1): 77-84.

Possebon S, Iorczeski R, Giacomini AC, Giacomini FL, Haas VR. Efeitos do treinamento físico e da Creatina Magnésio em músculos desnervados de ratos. *Rev Med. HVP*. 2001; 13 (29): 16-21.

Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochemistry International*. 2006: 1834-39.

Reichel H. Método Kabat: Facilitação Neuromuscular Proprioceptiva. São Paulo: Editorial Premier; 1998. 4p.

Reynolds ES. The use of lead citrate at light pH as an electron- opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*. 1963; 17: 208-12. Apud Teodori RM. Regeneração axonal após reparo nervoso com enxerto de músculo esquelético: Estudo Morfométrico [Tese de Doutorado]. 114p. Piracicaba: UNICAMP; 2000.

Robinson AJ, Snyder-Mackler L. Eletrofisiologia clínica: eletroterapia e teste eletrofisiológico. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2001. 43- 83p.

Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & Nerve*, [S.L.]. 2000; 23 (6): 863-73.

Rocha RSB. Eletroestimulação Diária e Alternada na Morfometria do Músculo Sóleo de Rato Desnervado [Dissertação de Mestrado]. 65p. Piracicaba: UNIMEP; 2006.

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.

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.

Salonen V, Peltonen J, Roytta M, Virtanen I. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J. Neurocytol*. 1987; 16: 713-20.

Santo Neto H, Teodori RM, Somazz MC, Marques MJ. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. *Br J Plast Surg*. 1998; 51(7): 555-60.

Santo Neto H, Pertille A, Teodori RM, Somazz MC, Marques MJ. Primary nerve repair by muscle autografts prepared with local anesthetic. *Microsurgery*. 2004; 24(3): 188-93.

Sakakima H, Yoshida Y, Sakae K, Morimoto N. Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. *Scand J. Med. Sci. Sports*. 2004; 14: 186-92.

Sarikcioglu L, Oguz N. Exercise training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. *Intern. J Neuroscience*. 2001; 109(3-4): 173-7.

Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em Cirurgia Experimental. *Acta Cir Bras*. [serial online]. 2004; 19(4): 441-47. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

Schmalbruch H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec*. 1986; 215 (1): 71-81.

Schroder JM. Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. *Brain Res*. 1972; 45(1):49-65.

Sebille A, Bondoux-Jahan M. Effects of electric stimulation and previous nerve injury on motor function recovery in rats. *Brain Res*. 1980; 193: 562-65.

Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle & Nerve*. 1990; 13: 785-800.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943; 66: 237-88.

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(7): 1267-76.

Sheffler LR, Chae J. Neuromuscular electrical stimulation in neurorehabilitation. *Muscle & Nerve*. 2007; 35: 562-90.

Shulman RG, Rothman DL. The "glycogen shunt" in exercising muscle: a role for glycogen in muscle energetics and fatigue. 2001; 98 (2): 457- 61.

Silva CA, Guirro RRJ, Cancelliero KM. Suprimento de glicose no músculo esquelético desnervado. *Saúde Rev*. 2004; 6 (14): 13-8.

Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Silva HC, Tanno AP, Rodrigues D. Efeito da metformina e eletroestimulação sobre as reservas de glicogênio do músculo sóleo normal e denervado. *Rev Bras Fisiot*. 1999; 3(2): 55-60.

Soucy M, Seburn K, Gardiner P. Is increased voluntary motor activity beneficial or detrimental during the period of motor nerve regeneration/reinnervation? *Can J Appl Physiol*. 1996; 21(3): 218-24.

Souza AVA. Efeito da Eletroestimulação Muscular de Baixa Frequência sobre a Regeneração do Nervo isquiático de Ratos submetidos a Axoniotmese [Dissertação de Mestrado]. 72p. Piracicaba: UNIMEP; 2005.

Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Periph Nerv Syst.* 2002; 7: 13-27.

Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: Basic Insights. *Brain Pathology.* 1999; 9: 313-25.

Strasberg SR, Watanabe O, Mackinnon SE, Tarasidis G, Hertl MC, Wells MR. Wire mesh as a post-operative physiotherapy assistive device following peripheral nerve graft repair in the rat. *J Periph Nerv Syst.* 1996; 1: 73-6.

Sunderland S. Nerve and nerve injuries. 2.ed. London: Churehill Livingston; 1978. Apud Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus.* 2004; 16(5): E1-7.

Tam SL, Archibald V, Jassar B, Tyreman N, Gordon T. Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. *J Neurosci.* 2001; 21(2):654-67.

Tam SL, Gordon T. Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *J Neurobiol.* 2003; 57 (2): 221-34.

Tanaka S, Tsubaki A, Tachino K. Effect of exercise training after partial denervation in rat soleus muscles. *J. Phys. Ther. Sci.* 2005; 17(2): 97-101.

Teodori RM. Regeneração axonal após reparo nervoso com enxerto de músculo esquelético: Estudo Morfométrico [Tese de Doutorado]. 114p. Piracicaba: UNICAMP; 2000.

Terada S, Tabata I. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1 α protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol. Metab.* 2004; 286: E208- 16.

Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat London.* 1999; 194 (1): 1-14.

Toft PB, Fugleholm K, Schmalbruch H. Axonal branching following crush lesions of peripheral nerves of rat. *Muscle & Nerve.* 1988; 11: 880-89.

Tsai YL, Hou CW, Liao YH, Chen CY, Lin FC, Lee WC et al. Exercise training exacerbates tourniquet ischemia-induced decreases in GLUT4 expression and muscle atrophy in rats. *Life Sciences.* 2006; 78: 2953 – 59.

Ueno N, Oh-ishi S, Kizaki T, Nishida M, Ohno H. Effects of swimming training on brown-adipose-tissue activity in obese ob/ob mice: GDP binding and UCP m-RNA expression. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1997; 95 (1): 92-104.

Van Meeteren NLU, Brakkee JH, Hamers FPT, Helders PJM, Gispen WH. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction

velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997a; 78 (1): 70-77.

Van Meeteren NLU, Brakkee JH, Helders PJM, Gispen WH. The effect of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat [abstract]. *J Periph Nerv Syst.* 1998; 3(4): 277-82.

Van Meeteren NLU, Brakkee JH, Helders PJM, Wiegant VM, Gispen WH. Functional recovery from sciatic nerve crush lesion in the rat correlates with individual differences in responses to chronic intermittent stress. *J Neurosci Res.* 1997b; 48: 524-32.

Van Meeteren NLU, Brakkee JH, Helders PJM, Croiset G, Gispen WH, Wiegant VM. Recovery of function after sciatic nerve crush lesion in rats selected for diverging locomotor activity in the open field. *Neurosci Letters.* 1997c; 238: 131-34.

Varejão ASP, Cabrita AM, Geuna S, Melo-Pinto P, Filipe VM, Gramsbergen A et al. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Exp Neurol.* 2003; 183 (2): 695-9.

Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita AMS. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods.* 2001; 108 (1): 1-9.

Varejão ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res.* 2004; 26 (2): 186-94.

Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst.* 2000; 5 (4): 191-208.

Vieira R, Haebisch H, Kokubun E, Hell NS, Curi R. Swimming system for physical exercise of rats. *Arq. Biol Tecnol.* 1988; 31(3): 387-94.

Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35 (11): 1389-94.

Voltarelli FA, Mello MAR, Gobatto CA. Glicogênio muscular e limiar anaeróbio determinado em ratos durante a natação. *Motriz, Rio Claro.* 2004; 10 (1): 25-30.

Wasserman K, Hansen JE, Sue D, Whipp BJ, Casaburi R. Principles of exercise testing and interpretation. 3. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1999.

Waxman SG, Bennett MV. Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system. *Nat New Biol.* 1972; 238 (85): 217-9.

Welch JA. Peripheral nerve injury. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1996; 11(4): 273-84.

Windisch A, Gundersen K, Szabolcs MJ, Gruber H, Lomo T. Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. *J Physiol.* 1998; 510 (Pt 2): 623-32.

Woodcock AH, Taylor PN, Ewins DJ. Long pulse biphasic electrical stimulation of denervated muscle. *Artif Organs.* 1999; 23(5): 457-9.

Wolthers M, Moldovan M , Binderup T, Schmalbruch H, Krarup C. Comparative electrophysiological, functional, and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery.* 2005; 25 (6): 508-19.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luis, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propp@power.ufscar.br - www.propp.ufscar.br

Protocolo CEEA nº 027/2006

Aprovo *ad referendum* da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar, o projeto pesquisa **Efeitos da Eletroestimulação e do Exercício Físico sobre a Regeneração Nervosa Periférica**, elaborado por Rosana Macher Teodori.

São Carlos, 5 de janeiro de 2007.


Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

~~Ceccotti HM, Sousa DD. Manual para normalização de dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, UNIMEP; 2007. Disponível em: <http://www.unimep.br/ppgft>.~~