

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Influência do exercício de natação no processo de regeneração
nervosa, reinervação muscular e recuperação funcional em ratos após
neurotmesa**

Joice Betini

2010

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOICE BETINI

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO NO PROCESSO DE
REGENERAÇÃO NERVOSA, REINERVAÇÃO MUSCULAR E
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL EM RATOS APÓS NEUROTOMIA**

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.

PIRACICABA

2010

Ficha Catalográfica

Betini, Joice

Influência do exercício de natação no processo de regeneração nervosa, reinervação muscular e recuperação funcional em ratos após neurotome. Piracicaba, 2010.

119p.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Macher Teodori

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

1. Natação. 2. Regeneração Nervosa. 3. Junção Neuromuscular. I. Teodori, Rosana Macher. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. III. Título

Dedico este trabalho ...

À Deus, por me guiar pelos caminhos corretos;

**Aos meus pais Nilson e Joseane, pelo constante incentivo e sábios
conselhos.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, porque para Ele, por Ele e por meio Dele são todas as coisas.

Aos meus pais por muitas vezes renunciarem seus sonhos para me ajudar a alcançar os meus, muito obrigada!!

À minha irmã Laís, que com carinho e bom humor me incentivou sempre.

Ao meu noivo Rodrigo, pela paciência e auxílio, e por aceitar os momentos de ausência.

À Profa. Dra. Rosana Macher Teodori pela confiança depositada em mim desde a graduação e pela orientação durante este trabalho, contribuindo com minha formação acadêmica.

À amiga Larissa Salgado de Oliveira que desde a graduação esteve ao meu lado sempre me orientando e auxiliando mesmo à distância.

Às professoras Dra. Elaine Minatel e Dra. Maria Júlia Marques, pelo tempo e conhecimento despendido e concessão do uso dos laboratórios do Instituto de Biologia da Unicamp, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Às professoras Dra. Adriana Pertille e Dra. Selma Maria M. Matheus, pelas indispensáveis contribuições a este trabalho.

À CAPES-Prosop pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia (PPGFt) sempre dispostos a ajudar e contribuir com os alunos.

À Profa. Maria Imaculada Montebelo pela imprescindível contribuição com a estatística.

Aos bolsistas de iniciação científica e voluntários do Laboratório de Plasticidade Neuromuscular pelo auxílio na fase experimental, nada seria possível sem vocês.

“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele, e ele tudo fará”.

(Salmo 37:5)

RESUMO

O exercício de natação tem sido utilizado para favorecer a recuperação funcional após lesão nervosa periférica. Portanto, este estudo avaliou as características morfológicas e funcionais do nervo e das junções neuromusculares após aplicação de um protocolo de natação em ratos submetidos a neurotome. Cinquenta ratos *Wistar* (198 ± 12 g), foram divididos nos grupos: Controle(C), Lesão(L), Enxerto(E) e Natação(N), com sobrevivência de 4, 8 e 12 semanas. Os animais do grupo N foram adaptados à natação antes da intervenção. Nos grupos L, E e N, um fragmento de 8mm do nervo isquiático esquerdo foi seccionado e retirado, sendo que nos grupos E e N o mesmo foi invertido e reconectado por 2 pontos de sutura epineural em cada extremidade. Vinte e quatro horas após a lesão os animais do grupo N foram submetidos à natação (30min/dia, durante 4, 8 e 12 semanas). Aplicou-se o Índice Funcional do Ciático (IFC), registrando semanalmente as impressões das patas dos animais no período pré-operatório e a partir do 7º dia pós-operatório (PO). Para obtenção do número de axônios, diâmetro do axônio e da fibra nervosa, espessura da bainha de mielina e razão G, o nervo foi processado, seccionado transversalmente e analisado em sistema de análise de imagens. Os receptores de acetilcolina (RACH) e as junções neuromusculares (JNM) do músculo sóleo foram quantificados a partir da técnica imunohistoquímica. Aplicaram-se os testes Anova-F seguido de Tamhane para análise das junções neuromusculares, morfologia axonal e número de axônios; Anova-F medidas repetidas, seguido de Bonferroni para IFC intragrupos; Anova-F seguido de Tamhane para IFC intergrupos, considerando $p < 0,05$. Observou-se aceleração no processo de brotamento e maturação axonal nos grupos submetidos a 4 semanas de natação. No grupo Natação 12 semanas os dados morfométricos atingiram valores de normalidade. Depois de 8 semanas o processo de eliminação sináptica foi iniciado no grupo Natação. Não foi observada recuperação funcional após 4 e 8 semanas em todos os grupos, porém no grupo N12 foi significativamente melhor que no E12, a partir da 10ª semana. Conclui-se que a natação acelerou o brotamento e a maturação das fibras regeneradas, a eliminação sináptica e a recuperação funcional após autoenxerto de nervo.

Palavras chave: Plasticidade neuronal; Regeneração nervosa; Natação; Junção Neuromuscular; Fisioterapia.

ABSTRACT

The swimming exercise has been used to promote functional recovery after peripheral nerve injury. Therefore, this study evaluated the morphological and functional nerve and neuromuscular junctions after application of a protocol of swimming in rats submitted to neurotmesis. Fifty Wistar rats (198 ± 12 g) were divided into groups: control (C), lesion (L), graft (E) and swimming (N), with survival rates of 4, 8 and 12 weeks. The animals in group N were adapted to swimming before the intervention. In groups L, E and N, a fragment of 8mm of the left sciatic nerve was sectioned and removed, while in groups E and N it was reversed and reconnected by 2 points to graft suture at each end. Twenty-four hours after injury the animals in group N were submitted to swimming (30min/day for 4, 8 and 12 weeks). We used the Sciatic Functional Index (SFI), recording weekly paw prints of animals in the preoperative period and from the 7th postoperative day (PO). To obtain the axons number, diameter of the axons and the nervous fibers, myelin thickness and G-ratio, the nerve was processed, cross-sectioned and analyzed from an image analysis. Acetylcholine receptors (AChR), and neuromuscular junctions (NMJ) of the soleus muscle were measured from the immunohistochemistry technique. The F-Anova followed by Tamhane test were applied for analysis of neuromuscular junctions, axonal morphology and number of axons; ANOVA-F repeated measures followed by Bonferroni test for IFC intragroup, ANOVA-F followed by Tamhane test for SFI-intergroup, considering $p < 0.05$. There was acceleration in the process of axonal sprouting and maturation in the groups submitted to 4 weeks of swimming. In the N group, after 12 weeks of swimming, the morphometric data reached normal values. After 8 weeks the process of synaptic elimination in the N group started. There was no functional recovery after 4 and 8 weeks in all groups, but the N12 group was significantly better than the E12, from the 10th week. It is concluded that swimming accelerated the sprouting and maturation of the regenerated nerve fiber, synaptic elimination and functional recovery after nerve autograft.

Keywords: Neuronal plasticity; Nerve regeneration; Swimming; Neuromuscular Junction; Physiotherapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. O Sistema Nervoso Periférico.....	15
2.2. Lesão Nervosa Periférica.....	18
2.3. Reparo Cirúrgico.....	20
2.4. Processos de Degeneração e Regeneração Nervosa.....	22
2.5. Estrutura da Junção Neuromuscular.....	27
2.5.1. Região Pré-Sináptica.....	28
2.5.2. Fenda Sináptica.....	29
2.5.3. Região Pós-Sináptica.....	30
2.5.4. Adaptações da JNM após Desnervação Muscular.....	32
2.6. Avaliação Funcional da Marcha.....	33
2.7. Influência do Exercício na Reinervação Muscular.....	35
2.7.1. Princípios dos Exercícios Aquáticos.....	41
3. OBJETIVO.....	45
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	46

4.1. Grupos Experimentais.....	46
4.2. Protocolo de Adaptação.....	47
4.3. Índice Funcional do Ciático (IFC).....	48
4.4. Procedimento Cirúrgico.....	49
4.5. Protocolo de Natação.....	52
4.6. Procedimento para Coleta do Material	53
4.6.1. Coleta e Processamento do Músculo Sóleo.....	53
4.6.2. Coleta e Processamento do Nervos Isquiático.....	55
4.7. Análise dos Dados.....	55
4.7.1. Análise Morfométrica do Nervos Isquiático.....	55
4.7.2. Análise Quantitativa das Fibras Nervosas Mielínicas.....	57
4.7.3. Análise Morfométrica das JNMs do Músculo Sóleo.....	58
4.7.4. Análise Funcional da Marcha.....	58
4.8. Análise Estatística.....	60
5. RESULTADOS.....	61
5.1. Análise dos Axônios.....	61
5.1.1. Características Macroscópicas no Local do Enxerto.....	61
5.1.2. Análise Histológica dos Nervos.....	61

5.1.3. Análise Morfométrica das Fibras Nervosas Mielínicas.....	64
5.1.4. Análise Quantitativa das Fibras Nervosas Mielínicas.....	66
5.2. Junção Neuromuscular.....	70
5.2.1. Análise Histológica das Junções Neuromusculares.....	70
5.2.2. Quantificação dos Receptores de Acetilcolina.....	72
5.2.3. Quantificação das JNMs.....	74
5.3. Análise Funcional da Marcha.....	78
5.3.1. Análise Intergrupos.....	78
5.3.2. Análise Intragrupo.....	81
6. DISCUSSÃO.....	84
6.1. Regeneração Axonal.....	84
6.2. Reinervação Muscular.....	92
6.3. Recuperação Funcional.....	95
7. CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO.....	118

1. INTRODUÇÃO

A neurotmesa é um tipo de lesão nervosa, em que ocorre a total desconexão entre o sistema nervoso central e o periférico. Os envoltórios conjuntivos são rompidos e a função é completamente perdida, sendo necessária intervenção cirúrgica. Nesse tipo de lesão, não é possível esperar uma recuperação espontânea significativa (Seddon, 1943; Welch, 1996; Lee, Scott e Wolfe, 2000; Burnett e Zager, 2004).

Avanços recentes nas técnicas e instrumental cirúrgico permitiram progressos que favoreceram consideravelmente o prognóstico das lesões nervosas periféricas nas últimas décadas. Porém, a restauração completa da morfologia e função de um nervo lesado ainda não foram alcançadas (Gama, 2000; Verdú et al., 2000; Yavuzer et al., 2002; Tetik et al., 2002; Sunderland et al., 2004).

Em decorrência desse tipo de lesão, as atividades de vida diária e laborais do indivíduo se tornam limitadas, o que pode levar à aposentadoria precoce devido à incapacidade funcional (Sunderland, 1990).

Experimentalmente, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de conhecer mais detalhadamente os processos que envolvem a regeneração e a degeneração de nervos, bem como os métodos eletrofisiológicos, histomorfométricos e funcionais que permitem avaliar sua recuperação (Varejão et al., 2001).

A grande maioria dos estudos disponíveis avalia os efeitos de diferentes técnicas de reparo nervoso, como autoenxerto de nervo (Mackinnon, Dellon e O'Brien, 1991; Santo Neto et al., 1998; You, So e Yip, 2000; Santo Neto et al., 2004), autoenxerto de músculo (Keynes, Hopkins e Huang, 1984; Glasby, 1990; Santo Neto et al., 1998; Santo Neto et al., 2004) e tubulização (Suematsu, 1989; Heijke, Klopper e Dutrieux, 1993; Danielsen, 1996; Lenihan et al., 1998; Battiston et al, 2000), porém poucos investigaram a influência de recursos fisioterapêuticos relacionados à facilitação do reparo nervoso, da reinervação muscular e da recuperação funcional após secção e reparo cirúrgico de nervos.

A Fisioterapia dispõe de diversos recursos que contribuem para a manutenção do trofismo e diminuição da fraqueza muscular após desnervação, favorecendo a recuperação funcional (Fernandes et al., 2005). Dentre os recursos mais utilizados estão a eletroestimulação fásica de baixa frequência (Fernandes et al., 2005; Oliveira et al., 2008), a eletroestimulação crônica de baixa frequência (Dow et al., 2004), o laser (Endo, 2002), o ultra-som (Monte-Raso et al., 2006), a estimulação elétrica de alta voltagem (Silva, 2009), o exercício em esteira (Van Meeteren et al., 1997; Marqueste et al., 2004; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006; Sobral et al., 2008; Ilha et al., 2008) e na água (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; Sarickcioglu e Oguz, 2001; Oliveira et al., 2008).

Diversas modalidades de exercício têm sido estudadas em ratos, porém, poucos autores citam o impacto da atividade física na fase de desnervação (Van Meeteren et al., 1997).

As consequências da utilização de exercícios físicos em músculos desnervados é um aspecto ainda muito discutido, especialmente em relação à

sua intensidade (Deschenes, Tenny e Kraimer, 1997; Sakakima et al., 2004) e ao melhor período para ser iniciado (Byun et al., 2005; Seo et al., 2006).

Estudos mais recentes apontam que o exercício físico favorece o restabelecimento das propriedades contráteis e metabólicas do músculo após desnervação (Marqueste et al., 2004; Tanaka, Tsubaki, Tachino, 2005), auxilia na remoção da mielina degenerada e, posteriormente, em sua síntese (Sarikcioglu e Oguz, 2001), aumentando o diâmetro axonal (Oliveira et al., 2008) e o número de brotos axonais (Seo et al., 2006), o que promove a regeneração de nervos lesados e a recuperação da função (Byun et al., 2005; Seo et al., 2006).

Considerando a escassez de estudos relacionados à investigação do efeito de diferentes recursos fisioterapêuticos sobre a regeneração nervosa e recuperação funcional após secção de nervos, este estudo apresenta os efeitos de um protocolo de exercício de natação sobre a regeneração axonal, reinervação muscular e recuperação funcional, contribuindo para a discussão sobre formas de intervenção fisioterapêutica aplicadas nesse tipo de lesão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O NERVO ESPINHAL

Os nervos fazem parte do sistema nervoso periférico (SNP), independente de ter origem espinhal ou cranial, é composto de fibras nervosas, camadas de tecido conjuntivo fibroso e vasos sanguíneos. As fibras nervosas incluem axônios dos neurônios motores somáticos, fibras aferentes somáticas dos músculos, pele e articulações, além de fibras do sistema neurovegetativo. Desta forma, um nervo contém tanto fibras nervosas mielínicas como amielínicas (Thomas, Landon e King, 1997; Waldram, 2003; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

Os axônios das fibras mielínicas são cobertos pela bainha de mielina formada por muitas camadas compactas da membrana plasmática das células de Schwann, interrompidas somente em regiões entre uma célula de Schwann e outra, formando os nodos de Ranvier. A função normal dessas fibras depende da integridade da bainha de mielina, a qual isola e protege o axônio, além de aumentar a velocidade de condução dos impulsos nervosos. As fibras motoras somáticas e proprioceptivas são as mielínicas de maior diâmetro, enquanto que as sensoriais que mediam os impulsos sensitivos são as de menor diâmetro (Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

As fibras amielínicas são envolvidas pelas células de Schwann, porém sem formar a mielina. Estas pequenas fibras estão dispersas entre as fibras mielínicas e incluem as fibras do SNV e sensoriais que mediam a dor e a temperatura. A

proporção de fibras amielínicas para mielínicas em um tronco nervoso periférico varia com a função do nervo, mas na maioria destes, aproximadamente 75% das fibras são mielínicas (Waldrum, 2003; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

As fibras nervosas que constituem os nervos são envoltas por sucessivas camadas de tecido conjuntivo com a função de protegê-las e sustentá-las. Fibras individuais são rodeadas por fibras colágenas tipo III, capilares e fibrócitos, constituindo o endoneuro. Este prove suporte para as fibras e as guia durante o processo de regeneração, além de nutrí-las (Lundborg, 1987; Lee, Scott e Wolfe, 2000).

Os fascículos são formados por grupos de fibras nervosas e envoltos por uma forte bainha de tecido conjuntivo fibroso com grande quantidade de fibras colágenas tipo I e III e fibras elásticas, constituindo a camada média chamada de perineuro (Lee, Scott e Wolfe, 2000). Esta bainha prove uma grande força mecânica, e ainda funciona como uma barreira de difusão perivascular. O perineuro isola quimicamente os feixes de fibras, preservando um ambiente fluido no interior dos fascículos, muito similar à proteção exercida pela barreira hematoencefálica no SNC. O perineuro atua como uma barreira para macromoléculas, podendo proteger as fibras nervosas de várias substâncias danosas, como certas toxinas, antígenos e vírus (Welch, 1996; Lundy-Ekman, 2004). Feixes de fascículos são ainda rodeados por uma camada de tecido conjuntivo mais externa, chamada de epineuro.

O epineuro caracteriza-se por ser um pouco mais frouxo do que o perineuro. Esta camada atua como um amortecedor durante os movimentos do nervo, protegendo os fascículos de traumas externos, além de manter o

suplemento de oxigênio através dos vasos epineurais. Além disso, a força de tensão e a elasticidade dos nervos residem predominantemente no tecido conjuntivo do epineuro. Sua quantidade varia entre os nervos e em diferentes locais ao longo do mesmo nervo, dependendo das forças de atrito que agem sobre estas regiões (Lundborg, 1987; Lee, Scott e Wolfe, 2000; Robinson e Snyder-Mackler, 2001).

O suprimento vascular do nervo é bem desenvolvido, pois os vasos são dispostos nas várias camadas que compõem a bainha conjuntiva e unidos por numerosas anastomoses, regulando o fluxo sanguíneo local. Sendo assim, formam uma reserva vascular mesmo quando o nervo sofre graves lesões (Pachioni et al., 2006).

Desta forma, a integridade das estruturas que compõem um nervo é essencial, pois são responsáveis por sua manutenção e preservação, além de participarem do processo de degeneração e regeneração nervosa (Burnett e Zager, 2004).

2.2. LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Os nervos são, na maioria das vezes, lesados em decorrência de acidentes automobilísticos, industriais, esportivos, fraturas, traumas penetrantes, tração excessiva ao nascimento (Welch, 1996; Robinson e Lawrence, 2000; Daneyemez, Solmaz e Izci, 2005) e transecções tumorais (Spector, Boss e Strecker, 1993).

Estes eventos podem causar compressão, estiramento, avulsão, secção parcial ou total (Sunderland, 1990) do tecido nervoso, já que em alguns pontos sua localização anatômica é superficial (Machado, 2000), levando a perda das funções motoras, sensitivas e autonômicas no território envolvido (Welch, 1996; Eberstein e Eberstein, 1996; Mendonça, Barbieri e Mazzer, 2003; Monte-Raso et al., 2006).

Cerca de 5% de todas as lesões traumáticas nas extremidades dos membros que ocorrem durante a prática esportiva e após acidentes automobilísticos são acompanhadas por danos em algum nervo (Ijkema-Paassen et al., 2004). Noble et al. (1998) relatam que 2,8% dos pacientes necessitam de intervenção cirúrgica para reparo do tecido nervoso. Outra estimativa aponta que entre 14 e 18% das lesões nas extremidades estão acompanhadas de lesões vasculares e nervosas (Waldram, 2003).

A maior incidência de lesão ocorre nos nervos mediano (32,3%), ulnar (24,1%), radial (12,1%), isquiático (10,7%) e fibular comum (7,7%), porém raramente no nervo tibial e femoral (Daneyemez, Solmaz e Izci, 2005). Entretanto, os mais susceptíveis são o radial no membro superior e o isquiático no membro inferior (Robinson e Lawrence, 2000).

De acordo com os diferentes comprometimentos estruturais e funcionais das lesões nervosas, seus diferentes tipos foram classificados.

Seddon (1943) classificou as lesões nervosas periféricas em neuropraxia, axoniotmese e neurotmese, usando como critério o grau de comprometimento estrutural e o prognóstico de recuperação.

Na neuropraxia, ocorre o bloqueio transitório da condução nervosa, com leve acometimento local da bainha de mielina, com preservação do axônio e da arquitetura do nervo, secundária à compressão. Porém, a recuperação se dá espontaneamente em poucos dias (Seddon, 1943; Welch, 1996; Lee, Scott e Wolfe, 2000; Burnett e Zager, 2004).

A axoniotmese leva à degeneração Walleriana distal, perda da continuidade axonal com preservação das células de Schwann e do endoneuro. Há bom prognóstico, pois a estrutura conjuntiva permanece íntegra e auxilia o brotamento axonal e a reinervação (Seddon, 1943; Welch, 1996; Lee, Scott e Wolfe, 2000; Burnett e Zager, 2004; Oliveira et al., 2008).

Na neurotmese, ocorre a total desconexão entre SNP e SNC, com rompimento dos envoltórios conjuntivos e perda completa de função. O axônio, os tubos endoneurais e as células de Schwann são completamente rompidos, o perineuro e o epineuro sofrem ruptura em graus variáveis. Nesse tipo de lesão, não é possível esperar uma recuperação espontânea significativa, sendo necessária reconexão cirúrgica dos segmentos proximal e distal do nervo (Seddon, 1943; Welch, 1996; Lee, Scott e Wolfe, 2000; Burnett e Zager, 2004; Ijiekema-Paassen et al., 2004).

Sendo assim, os processos de degeneração e regeneração nervosa ocorrem de forma diferenciada, de acordo com o tipo e extensão da lesão, bem como a técnica cirúrgica escolhida (Burnett e Zager, 2004; Ijiekema-Paassen et al., 2004).

2.3. REPARO CIRÚRGICO

O desenvolvimento da técnica microcirúrgica (Millesi, 1984) proporciona a melhora da reconstrução e dos resultados funcionais. No entanto, a recuperação funcional ainda é considerada limitada (Lundborg, 1988). Acredita-se que tensões elevadas nas extremidades reconstruídas provoquem efeitos inibitórios na regeneração neural, provavelmente devido à isquemia (Ijkema-Paassen et al., 2004). Atualmente são utilizados como padrão, a interposição de auto-enxertos de nervo no tratamento de perdas segmentares e de defeitos extensos. Os nervos sensitivos cutâneos são, geralmente, escolhidos como doadores destacando-se os nervos sural, cutâneo medial do braço, cutâneo medial do antebraço, cutâneo ânterolateral do antebraço e safeno, dentre outros (Jewett e McCarroll, 1980).

As principais desvantagens relacionadas ao uso dos auto-enxertos de nervo são: a necessidade de múltiplos procedimentos em diferentes regiões anatômicas e danos ao sítio doador (Verdú et al., 2000).

Várias opções de tecidos e de materiais condutores têm sido propostos para o tratamento das perdas segmentares dos nervos, entre os quais destacam-se: os enxertos autógenos (Hasegawa et al., 2004; Pierucci, Duek e Oliveira, 2008), heterógenos (Heath e Rutkowski, 1998) e acelulares de nervos (Yu et al., 2009; Walsh et al., 2009); implantes confeccionados com materiais de base orgânica e sintética (Mackinnon e Dellon, 1990; Schmidt e Leach 2003; Midha et al., 2003), biodegradáveis ou não (Ijkema-Paassen et al., 2004; Ashley, Weatherly e Park, 2006).

Quando ocorre a secção total do nervo, o método clássico de reparo ainda é a sutura epineural (Millesi, 1981; Kline, 1990). Entretanto, quando a lesão provoca perda substancial de tecido nervoso, não deve ser reparada por sutura direta dos segmentos nervosos, pois pode provocar tensão excessiva no nervo, prejudicando sua circulação sanguínea e favorecendo a formação de tecido cicatricial, que atua como um fator mecânico impedindo o crescimento dos axônios (Fawcett e Keynes, 1986). Nesses casos é necessário o uso de enxerto (Fawcett e Keynes, 1986; Santo Neto et al., 1998; Yuksel et al., 1999; McCalister et al., 2001).

O autoenxerto convencional de nervo ainda é o método mais eficiente e praticado pelos cirurgiões após lesões com perda de tecido nervoso (Sunderland, 1990; Spector, Boss e Strecker, 1993; Lolley et al., 1995; Chatdokmaiprai, Suwansingh e Worapongpaiboon, 2006; Kotulska et al., 2007). Este tipo de reparo tem como objetivo guiar os axônios em crescimento e preencher o espaço entre as extremidades proximal e distal do nervo, diminuindo a tensão nas linhas de sutura, e favorecendo sua recuperação (Terzis, Skoulis e Soucacos, 1995).

2.4. PROCESSOS DE DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA

A degeneração Waleriana e a cromatólise, o brotamento axonal, a reinervação do órgão-alvo e a maturação axonal são as 4 fases que envolvem o processo de regeneração axonal (Verdú et al., 2000).

Durante este processo o corpo do neurônio se dilata, sofrendo cromatólise central, havendo desintegração dos grânulos de Nissl e mudanças metabólicas para produção de neurotransmissores necessários à ativação sináptica, produção de RNAm, lipídios, actina, tubulina e proteínas do citoesqueleto associadas ao crescimento, participantes do processo de reparação (Welch, 1996; Lee, Scott e Wolfe, 2000) (Figura 1).

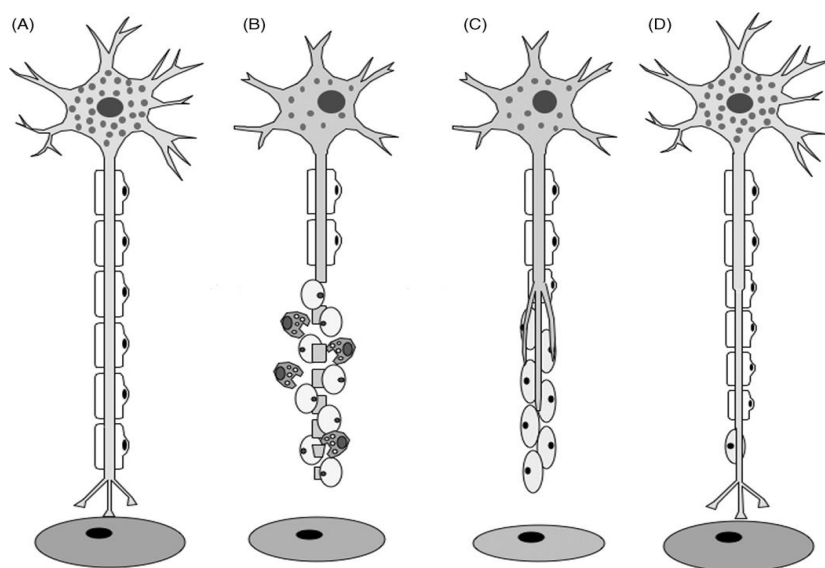


Figura 1 - Esquema dos principais eventos decorrentes de secção nervosa. (A) fibra nervosa normal conectada ao órgão-alvo; (B) fibra nervosa seccionada com fragmentação do axônio e da mielina; (C) brotamento axonal com proliferação de células de Schwann no segmento distal formando o tubo endoneural; (D) reconexão do órgão-alvo e maturação da fibra nervosa.

Fonte: Navarro, Vivo e Valero-Cabre (2007).

No segmento proximal, as células de Schwann degradam os restos de axônio e mielina degenerada da região acometida e segmentos próximos, se estendendo proximalmente por mais 1 ou 2 nódulos de Ranvier, podendo atingir o corpo celular e causar apoptose, caso a lesão esteja muito próxima ao corpo celular (Welch, 1996; Lee, Scott e Wolfe., 2000; Burnett e Zager, 2004).

As fibras distais ao local da lesão são desconectadas do corpo celular e degeneram. Há a desintegração do citoesqueleto axonal e da bainha de mielina. Entre 2 e 3 dias após a lesão, há a infiltração de macrófagos no nervo em degeneração. Este recrutamento de macrófagos é o principal caminho para a fagocitose da mielina e do axônio degenerados (Fawcett e Keynes 1990; Verdú et al., 2000; Lee, Scott e Wolfe, 2000).

Durante a degeneração os macrófagos sintetizam e secretam muitas citocinas que promovem a mitose das células de Schwann. Estas células mitogênicas se tornam fagócitos e auxiliam os macrófagos na degradação da mielina degenerada. As células de Schwann também secretam muitos fatores neurotróficos que promovem o crescimento axonal (Verdú et al., 2000).

A degeneração é acompanhada de mudanças fenotípicas no corpo do axônio seccionado, incluindo dilatação e migração do núcleo para a periferia e um aumento no tamanho do núcleo e do nucléolo. A degeneração Waleriana cria um microambiente distal ao local da lesão que é favorável ao crescimento axonal dos neurônios sobreviventes, enquanto a reação retrógrada e a cromatólise representam mudanças metabólicas para sustentar o crescimento axonal (Verdú et al., 2000; Lee, Scott e Wolfe 2000; Waldram, 2003).

Poucas horas após a secção nervosa experimental forma-se, na extremidade do axônio proximal, um cone de crescimento, do qual emergem de 2 a 3 finos brotos axonais. Estes brotos penetram no segmento distal do nervo e crescem no interior do tubo endoneural em direção ao órgão-alvo. O aumento do axoplasma para o crescimento é o resultado do aumento da síntese de proteínas e outros materiais, no corpo neuronal, que são guiados para a extremidade distal

por transporte axonal. A orientação do avanço da extremidade depende das características do segmento distal e da produção de fatores neurotróficos (Fawcett e Keynes 1990; Verdú et al., 2000; Lee, Scott e Wolfe 2000; Waldram, 2003).

Na ausência de estruturas guia, como o segmento distal do nervo, a regeneração dos axônios se torna tortuosa e formam-se os neuromas, compostos de brotos axonais imaturos e tecido conjuntivo, impedindo a reconexão nervo-músculo (Fried et al., 1991).

Os fatores de crescimento axonal são providos principalmente pelo corpo celular, via transporte axonal (Hoffman e Lasek, 1980; McQuarrie e Lasek, 1989), porém, mais recentemente descobriu-se que a síntese axonal e a degradação de proteínas local também auxiliam este processo (Willis et al., 2005).

Os fatores neurotróficos são proteínas presentes nos receptores motores e sensoriais desnervados. Também são encontrados dentro das células de Schwann ao longo do local em regeneração. Favorecem a sobrevivência, crescimento e maturação dos neuritos (Lee, Scott e Wolfe, 2000).

As células de Schwann produzem fatores neurotróficos chamados de neurotrofinas, entre as principais estão o fator de crescimento neuronal (NGF) e o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) entre outros. Essas neurotrofinas se dispersam difusamente ao redor do axônio e promovem a sobrevivência neuronal estimulando o crescimento axonal, além de exercer uma função trófica na ausência da inervação do órgão-alvo (Ide, 1996).

Outros fatores neurotróficos importantes para a regeneração axonal são a laminina e a fibronectina. A laminina é o principal componente da lâmina basal da célula de Schwann, composta por colágeno tipo IV e proteoglicanas, responsáveis

por acelerar a regeneração axonal. A fibronectina, ao se polimerizar com o fibrinogênio, forma a matriz de fibrina, que é um importante substrato responsável pela migração de células tróficas para o nervo em regeneração, facilitando o crescimento dos neuritos (Sanes e Lichtmann, 1999; Lee, Scott e Wolfe 2000).

Quando os axônios atingem o órgão-alvo ocorre a poliinervação. Os brotos axonais supranumerários são eliminados gradualmente, à medida que a reconexão nervo alvo é restabelecida. As fibras nervosas que se regeneram e atingem alvos incorretos, como acontece quando um axônio motor reinerva a pele, também são eliminadas. Isso acontece quando há desvio de rota axonal (Brushart et al., 1998).

Com o restabelecimento do contato entre o terminal nervoso e os receptores de acetilcolina da junção neuromuscular, o nervo estimula o músculo a sintetizar acetilcolinesterase e a diminuir a síntese de receptores extrajuncionais. Concomitantemente, ocorre a redução de fatores de crescimento liberados pelo músculo e pelo corpo celular, com conseqüente diminuição dos contatos sinápticos excedentes, conhecido como eliminação sináptica (Gorio et al., 1983; Carmignoto et al., 1983; Favero et al., 2007). O processo de eliminação sináptica é desencadeado pela membrana pós-sináptica que inibe o crescimento dos neuritos, transforma os neuritos regenerados em terminais nervosos e o cone de crescimento em botão sináptico, havendo a reinervação do músculo (Gorio et al., 1983; Favero et al., 2007).

As células de Schwann deixam de produzir fatores tróficos e então se tornam responsáveis por fornecer estabilidade estrutural à junção neuromuscular, formando pontes entre as junções inervadas e desnervadas. Neste momento, o músculo se torna ativo novamente e a contração muscular inibe a produção de

fatores tróficos anteriormente liberados devido a sua inatividade (Love, Son e Thompson, 2003).

Após a reinervação ocorre a maturação dos axônios regenerados e das conexões terminais. A maturação inclui progressivas mudanças para a restauração da dimensão normal e da velocidade de condução do nervo. Durante esta fase o calibre do axônio regenerado e a espessura da bainha de mielina aumentam, suportadas por mudanças metabólicas que sustentam o aumento da síntese de mielina e de proteínas do citoesqueleto das células de Schwann e dos axônios. Porém, o diâmetro médio das fibras alcança apenas 75% dos valores normais (nervo isquiático), mesmo após um longo período de desnervação, sendo acompanhada por uma progressiva recuperação da transmissão sináptica e da velocidade de condução nervosa que também permanece abaixo dos valores normais por um longo tempo após a lesão (Verdú et al., 2000).

Waldram (2003) também cita que após o processo regenerativo o axônio normalmente não recupera sua estrutura original nem sua função, especialmente em lesões do tipo neurotmesa. Reforçam que, após a lesão e reparo nervoso, o diâmetro dos axônios regenerados, sua velocidade de condução e excitabilidade permanecem abaixo dos níveis normais, com conseqüente diminuição da recuperação dos órgãos reinervados.

2.5. ESTRUTURA DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

A junção neuromuscular (JNM), é uma sinapse química que utiliza a acetilcolina (ACh) como neurotransmissor. É responsável por converter a informação do nervo para o músculo, estando diretamente envolvida no processo de contração muscular (Lieber, 2002; Willmann e Fuhrer, 2002).

A JNM possui três elementos estruturais principais: a região pré-sináptica, que contém o terminal nervoso parcialmente envolto pela célula de Schwann; a fenda sináptica, ocupada pela lâmina basal; e a região pós-sináptica, constituída pela membrana pós-sináptica especializada do músculo, conforme mostra a figura 2. Todos os três componentes da sinapse contém organelas e moléculas não encontradas em regiões extra-sinápticas (Hughes, Kusner e Kaminski, 2006).

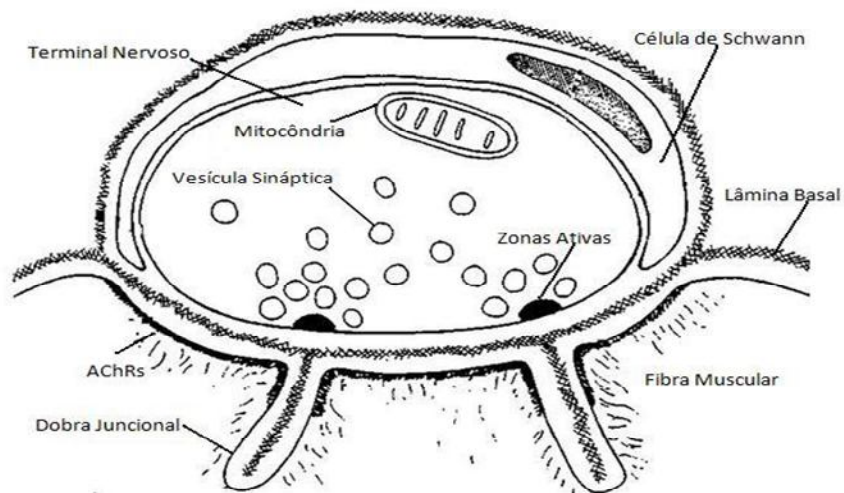


Figura 2 - Esquema da junção neuromuscular. Componentes da região pré-sináptica (terminal nervoso e célula de Schwann), fenda sináptica (lâmina basal preenchendo as fendas sinápticas primária e secundária) e da região pós-sináptica (receptores de acetilcolina – AChRs, situados no topo das dobras juncionais do sarcolema juncional).

Fonte: Adaptado de Sanes e Litchmann, 1999.

2.5.1. Região Pré-Sináptica

Antes de atingir a região pré-sináptica os axônios são envoltos por bainhas de mielina e chamados de axônios pré-terminais. Ao alcançar o músculo, ramificam-se por todo o tecido conjuntivo intramuscular e passam a ser chamados de axônios terminais. Nos locais de junção neuromuscular, os axônios terminais perdem sua bainha de mielina e se diferenciam em estruturas muito especializadas que constituem o terminal nervoso pré-sináptico, na fenda sináptica primária (Carmignoto et al., 1983; Hall e Sanes, 1993).

As principais características ultra-estruturais do terminal nervoso são a presença das vesículas sinápticas, que são sintetizadas no corpo dos motoneurônios e transportadas por meio dos axônios até o terminal. As vesículas se concentram nas zonas ativas que compreendem a parte interna da membrana pré-sináptica, onde se fundem à membrana do terminal nervoso para liberação da ACh na fenda sináptica (Hall e Sanes, 1993; Sanes e Lichtman, 1999; Lieber, 2002; Ruff, 2003). Sua função é estocar e liberar a ACh. Além disso existem as mitocôndrias, que dão suporte ao seu funcionamento (Hall e Sanes, 1993; Hughes, Kusner e Kaminski, 2006).

Outro importante componente da região pré-sináptica são as células de Schwann, que emitem processos que envolvem o terminal nervoso dos motoneurônios com o objetivo de protegê-los de lesões químicas e mecânicas (Hall e Sanes, 1993; Sanes e Lichtman, 1999).

Após a liberação da ACh, as vesículas são reabsorvidas por endocitose pela superfície pré-sináptica, para posterior formação de novas vesículas (Willmann e Fuhrer, 2002; Hughes, Kusner e Kaminski, 2006).

2.5.2. Fenda Sináptica

A JNM possui duas fendas sinápticas: a primária, que compreende o espaço entre o terminal nervoso e a fibra muscular, sendo ocupada pela lâmina basal sináptica, e a secundária, formada pelo espaço entre as dobras juncionais do sarcolema pós-sináptico e a lâmina basal (Sanes, 2003).

A fenda sináptica é preenchida pela membrana basal, que se prolonga até as dobras juncionais, se fundindo à membrana basal das células de Schwann. A membrana basal emite finos processos que são responsáveis por conectar a fibra muscular e o terminal nervoso (Hall e Sanes, 1993; Sanes, 2003).

Extremamente especializada, a membrana basal sináptica, possui proteínas em sua matriz extracelular que regulam a síntese e a concentração da acetilcolinesterase pós-sináptica, que é importante no processo de contração e relaxamento muscular (Hall e Sanes, 1993; Ribchester, 2009).

2.5.3. Região Pós-Sináptica

Os componentes da região pós-sináptica são designados para otimizar a transmissão dos sinais químicos vindos do terminal nervoso para produzir a contração muscular após a liberação da ACh (Hughes, Kusner e Kaminski, 2006).

A região pós-sináptica é composta pelo sarcolema, que contém dobras juncionais formadas pelo seu pregueamento para aumentar a superfície pós-sináptica e, portanto, a eficácia da transmissão sináptica (Marques et al., 2000). Após a membrana pós-sináptica há um aglomerado de núcleos subsinápticos que transcrevem proteínas encontradas na membrana sarcoplasmática sináptica (Hall e Sanes, 1993; Ribchester, 2009).

As dobras juncionais são formadas por duas regiões: o ápice, onde se concentram os receptores de acetilcolina (RACHs) e o fundo das dobras, onde estão os canais de sódio, responsáveis pela geração do potencial de ação, e as moléculas de adesão celular neuronal (NCAM) (Hall e Sanes, 1993; Ruff, 2003). A NCAM é uma proteína encontrada exclusivamente na junção neuromuscular adulta, exceto quando ela se encontra em processo de regeneração (Hall e Sanes, 1993). Durante este processo a expressão da NCAM é aumentada, estimulando o brotamento axonal e a reconexão nervo-músculo, atuando como facilitadora da regeneração nervosa, (Ide, 1996; Walsh et al., 2000). Além desta, o indutor de atividade de acetilcolina (ARIA), que é um fator neuronal envolvido no acúmulo específico de RACHs na junção, também é encontrado na região pós-sináptica (Grinnel, 1995).

Os RACHs são pentâmeros de sub-unidades homólogas que delimitam um canal iônico central responsável pela recepção e transdução do sinal do terminal

nervoso (Hall e Sanes, 1993). São sintetizados no sarcolema pela expressão de vários genes encontrados nos núcleos sub-sinápticos e sua repressão ocorre nos núcleos extra-sinápticos. Os RACHs constituem os canais iônicos que se abrem quando a ACh é liberada, sendo responsáveis pela recepção e transmissão de sinais químicos (Hall e Sanes, 1993; Sanes e Lichtman, 1999).

Sendo assim, a ativação muscular ocorre após a despolarização do terminal nervoso. Neste momento a ACh armazenada nas vesículas sinápticas é liberada na fenda sináptica e se liga aos receptores pós-sinápticos, que abrem seus canais de sódio levando a despolarização da fibra muscular, com consequente contração da musculatura. Este processo é controlado pela acetilcolinesterase, que é uma importante proteína responsável por degradar a ACh, permitindo que os receptores retomem sua receptividade (Sanes, 2003).

2.5.4. Adaptações da JNM após Desnervação Muscular

A JNM demonstra uma impressionante plasticidade quando submetida a alterações na atividade neuromuscular, mesmo em animais adultos. Uma abrupta e completa paralisação da atividade neuromuscular por meio da desnervação ou indução por neurotoxinas modula sua estrutura e função (Deschenes et al., 2003).

Em músculos desnervados as células de Schwann liberam fatores de crescimento que estimulam o brotamento e a regeneração axonal, enquanto a JNM não exerce nenhuma atração sobre este processo. Por outro lado a JNM libera substâncias que, após o contato nervo-músculo, inibem o crescimento

axonal, transformando o neurito em regeneração num terminal nervoso e ativando o mecanismo chamado de eliminação sináptica (Carmignoto et al., 1983).

Os axônios em regeneração mostram uma grande preferência pelos sítios sinápticos originais. Desta forma, mais de 95% do contato formado pelos axônios em regeneração com as fibras musculares ocorre nos locais originais. Esse crescimento axonal preciso tem sido associado à liberação de fatores tróficos pela lamina basal do nervo e pela superfície da fibra muscular. Estudos mostram que estes fatores estão associados a lamina basal e muitos tem sido identificados, dentre eles estão a laminina, variações do colágeno tipo IV, proteoglicanas e fatores de crescimento já mencionados. Porém, não se sabe se algum desses fatores é responsável pela reinervação seletiva dos locais sinápticos, mas muitos tem mostrado influência na diferenciação pré e pós sináptica (Sanes, 2003).

Outra alteração importante observada após a lesão está nos RACHs. Na fase inicial do desenvolvimento, os RACHs revestem toda a fibra muscular e integram o sarcolema. A partir do contato do nervo com a fibra muscular, os RACHs se agrupam nesse local de contato. Este processo leva a uma diminuição do número de RACHs extrajuncionais e um aumento do número de RACHs juncionais. A desnervação causa inversão deste processo, portanto há um aumento no número de receptores extrajuncionais no músculo, tornando-o mais receptivo à reinervação (Lieber, 2002).

2.6. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MARCHA

As lesões traumáticas experimentais do nervo isquiático de ratos causam severos déficits na função motora do membro pélvico ipsilateral à lesão e sobrecarga funcional no membro contralateral, determinando um padrão locomotor alterado, o qual impede a correta execução da marcha (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982; Bridge et al., 1994; Ilha et al., 2008).

Bain, Mackinnon e Hunter (1989) afirmam que a secção do nervo isquiático resulta na diminuição da função do nervo fibular e aumento do comprimento da pegada devido a alteração funcional dos plantiflexores. Essas alterações morfofuncionais, invariavelmente, produzem os artefatos que prejudicam a impressão das pegadas durante a deambulação, principalmente nos estágios iniciais da lesão.

Diante disto, várias técnicas tem sido propostas para avaliar a recuperação funcional de animais após lesão nervosa. Entre elas estão a eletrofisiologia do nervo e do músculo, testes clínicos, mensurações do transporte axonal, histologia axonal e a recuperação funcional (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982; Dijkstra et al., 2000; Oliveira et al., 2001).

De Medinacelli, Freed e Wyatt (1982), desenvolveram um método quantitativo para analisar o desempenho dos membros inferiores de ratos, examinando suas pegadas, conhecido como Índice Funcional do Ciático (IFC). Mais tarde, esse método foi modificado por outros autores, conforme as suas necessidades particulares (Bain, Mackinnon e Hunter, 1989; Bervar, 2000;

Varejão et al., 2001). Desde então o IFC tem sido considerado um importante indicador da recuperação da função global.

Para a avaliação da marcha por meio do IFC são utilizadas algumas medidas das patas dos animais, como: a largura da pegada, que é a distância entre o primeiro e o quinto dedo (LP); a largura intermediária da pegada, que corresponde à distância entre o segundo e o quarto dedo (LI); e o comprimento da pegada, que é a distância entre o terceiro dedo e o calcâneo (CP). Estas medidas são obtidas das patas normal e experimental dos animais (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982; Varejão et al., 2001, 2003 e 2004).

Para determinar a recuperação funcional de animais, De Medinacelli, Freed e Wyatt (1982) desenvolveram uma fórmula, que posteriormente foi modificada por Bain, Mackinnon e Hunter (1989), capaz de indicar a relação existente entre os músculos inervados pelo nervo isquiático e os padrões de marcha apresentados pelos animais após a lesão. Nesta fórmula são organizados os valores obtidos nas medidas das patas dos animais.

Os resultados obtidos nesta fórmula expressam a recuperação funcional, sendo assim os valores entre 0 e -20 indicam função normal (Hare et al., 1992) e valores próximos ou inferiores a -100 apontam para perda de função do membro pélvico (Bain, Mackinnon e Hunter, 1989).

Após secção nervosa, a recuperação funcional é limitada e pode se estender por meses. Os principais fatores limitantes da recuperação são conexões inadequadas entre os axônios e o órgão-alvo, aderências teciduais, além de atrofia e contraturas musculares decorrentes de longos períodos de imobilização (Alluin et al., 2009).

Longos períodos de desnervação podem trazer consequências que podem limitar a avaliação funcional por meio do IFC, como as contraturas em flexão plantar, que obrigam o animal a deambular com o dorso da pata, o excesso de tecido fibroso, que causa eversão e dorsiflexão da pata, elevando o quinto dedo durante a marcha, além da autotomia, muito comum após secção nervosa e que impossibilita a mensuração e avaliação funcional (Hare et al., 1992; Varejão et al., 2004; Alluin et al., 2009).

Apesar das limitações do IFC, este ainda é o método de avaliação da marcha mais utilizado para avaliar o retorno funcional após lesão nervosa, pois não é invasivo, é de fácil aplicação e avalia componentes sensoriais e motores, além de ser o que mais se aproxima das condições clínicas de avaliação (Varejão et al., 2004; Wolthers et al., 2005).

2.7. INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO NA REINERVAÇÃO MUSCULAR

Com finalidade de amenizar os danos estruturais e funcionais decorrentes da desnervação, diversos recursos fisioterapêuticos são utilizados no sentido de influenciar positivamente o processo de recuperação funcional. Dentre eles, considera-se a estimulação elétrica fásica de baixa frequência (Fernandes et al., 2005), a estimulação elétrica de alta voltagem (Silva, 2009), o ultra-som (Monte-Raso et al., 2006), o laser (Endo, 2002) e os exercícios físicos em esteira (Van Meeteren et al., 1997; Marqueste et al., 2004; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006; Sobral et al., 2008; Ilha et al., 2008) e na água (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; Sarickcioglu e Oguz, 2001; Oliveira et al., 2008).

O exercício físico caracteriza-se por uma situação que retira o organismo de sua homeostase, pois implica no aumento instantâneo da demanda energética da musculatura exercitada e, conseqüentemente, do organismo como um todo. Assim, para suprir a nova demanda metabólica, várias adaptações fisiológicas são necessárias durante o exercício físico (Gobato et al., 2001).

Trata-se de um recurso bastante utilizado para manutenção das propriedades musculares após a desnervação, por aumentar os capilares sanguíneos, as mitocôndrias, a captação de glicose, manter o trofismo e minimizar a fraqueza muscular, além de estimular a atividade funcional após reinervação (Possebon et al., 2001).

Estudos também tem demonstrado que o exercício auxilia na remoção da mielina degenerada e em sua síntese durante o processo de regeneração (Sarickcioglu e Oguz, 2001), favorecendo o aumento da velocidade de condução do impulso nervoso e a recuperação sensório-motora (Van Meeteren et al., 1997).

Eisen et al. (1973) propuseram uma forma de estimular o membro desnervado após esmagamento do nervo isquiático de ratos. Os autores observaram alterações morfológicas no nervo ao imobilizar o membro desnervado num grupo de animais e imobilizar o membro íntegro em outro grupo, obrigando o animal a utilizar a pata desnervada. O estudo apontou para um aumento do diâmetro médio das fibras nervosas mielinizadas no grupo que teve a pata íntegra imobilizada quando comparado com os efeitos da imobilização do membro lesado.

Herbison, Jaweed e Ditunno (1974), propuseram um protocolo de exercício para ratos com lesão bilateral do nervo isquiático. Os animais foram divididos em

4 grupos, dois deles iniciaram o exercício de natação 3 semanas após a lesão, durante 3 semanas, nadando por uma ou duas horas, respectivamente. Os outros dois grupos iniciaram o exercício após 4 semanas de desnervação, treinando por duas semanas, durante uma ou duas horas, respectivamente. Verificaram que o exercício físico foi mais efetivo nos ratos que iniciaram o treinamento após quatro semanas, afirmando que o exercício na fase precoce inibe o processo de reinervação.

Hie, Van Nie e Vermeulen-Van der Zee (1982), submeteram ratos desnervados a exercício em esteira por 2 horas diárias durante 18 semanas, após 18 dias de secção do nervo isquiático. Afirmaram que o exercício nesta fase da reinervação leva a efeitos positivos no peso, na contração e nas características histológicas do músculo, proporcionando condições fisiológicas favoráveis para a recuperação funcional. Em 1987, os mesmos autores repetiram o estudo para avaliar a recuperação funcional dos animais. Observaram que o exercício não alterou a reinervação nem a distribuição das fibras musculares, portanto não causa danos musculares.

Sarikcioglu e Oguz (2001), ao aplicar natação em coelhos após esmagamento do nervo isquiático, observaram que nos animais que iniciaram o exercício após quatro semanas da lesão tiveram a mielina fagocitada e a mielinização das fibras acelerada em relação ao grupo não exercitado.

Marqueste et al. (2004) submeteram ratos a exercício em esteira e a eletroestimulação por uma hora e meia, duas vezes ao dia, 5 dias/semana durante 10 semanas após secção, autoenxerto e sutura direta do nervo. Observaram que a eletroestimulação foi eficiente na manutenção do peso

muscular e que o protocolo de exercício proposto foi capaz de aumentar a resistência à fadiga, restaurar as propriedades contráteis e a mecano-sensibilidade muscular.

Byun et al. (2005) submeteram ratos a exercício em esteira 3 dias após o esmagamento do nervo isquiático. Os animais correram 30 min/dia durante 12 dias consecutivos. Observaram que o exercício foi efetivo na recuperação funcional, aumentando os valores do Índice Funcional do Ciático (IFC) e inibindo a expressão de fatores tróficos como o BDNF.

Seo et al. (2006), apontaram resultados semelhantes em seu estudo em ratos que realizaram o exercício na esteira após 12 horas do esmagamento do nervo isquiático (30 min, 2x/dia, 14 dias.) Consideraram que a corrida favoreceu a recuperação sensório-motora e a regeneração axonal além de regular a síntese protéica pelas células de Schwann.

Ilha et al. (2008), desenvolveram um protocolo de treinamento aeróbico e de resistência muscular em esteira, bem como a combinação entre eles, após compressão nervosa em ratos e analisaram as características morfológicas e funcionais do nervo após 5 semanas de treinamento. Observaram ganho funcional e aceleração na regeneração nervosa nos animais submetidos ao exercício aeróbio quando comparado aos submetidos ao treino de força ou a combinação dos dois tipos.

Oliveira et al. (2008), aplicaram exercício de natação em ratos submetidos a axoniotmese durante 30 minutos diários, observando aumento no diâmetro axonal. Entretanto, não puderam considerar que o exercício acelerou a maturação dos axônios regenerados porque não observaram diferença no diâmetro das fibras nervosas em relação ao grupo desnervado não submetido à natação.

O suporte do peso corporal também parece ser um importante fator na recuperação funcional. Por isso, Matsuura et al. (2001), comprimiram o nervo isquiático de ratos e permitiram que seu peso fosse suportado pelas duas patas pélvicas e observaram que estes animais apresentaram ganho na tensão tetânica muscular e na recuperação funcional em comparação com ratos que tiveram seus membros pélvicos suspensos.

Substâncias relacionadas à criação de um microambiente favorável à regeneração nervosa, como os fatores neurotróficos, tem sido identificadas como um dos principais responsáveis pela relação exercício-regeneração nervosa. Estes elementos orgânicos podem estar expressos de forma direta no tecido muscular durante o processo de regeneração e recuperação nervosa, favorecendo assim a recuperação morfológica e funcional (Carroll et al., 1992; Mannion et al., 1999; Gómez-Pinilla et al., 2001; 2002; Ying et al., 2003; Rummeler e Gupta, 2004).

Os fatores neurotróficos, originalmente descritos por sua influência no crescimento e diferenciação neuronal, estão se tornando reconhecidos como reguladores da plasticidade sináptica (Yao et al., 1998; McAllister, Katz e Lo, 1999; Klintsova e Greenough, 1999). Os níveis destes fatores e/ou seus receptores podem ser alterados pela atividade neuronal, promovendo meios potenciais para perpetuar as mudanças na transmissão sináptica (Al-Majed, Brushard e Gordon, 2003; Canossa et al., 2001). Estudos comprovam que estas substâncias são efetivas no restabelecimento morfológico pós-lesão nervosa (Midha et al., 2003).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e as neurotrofinas 3 (NT-3) e 4 (NT-4) são importantes para a regulação da função sensório-motora

(Carrow et al., 1992; Mannion et al., 1999; Thompson et al., 1999). Após exercícios físicos voluntários, a expressão de BDNF e NT-3 é aumentada na medula espinhal e no tecido muscular (Gómez-Pinilla et al., 2001; 2002; Ying et al., 2003). Estes indícios sugerem que a prática de exercício físico seja um fator de sinalização neurotrófica, já que potencializa a produção de fatores tróficos por meio do aumento da atividade neuromuscular ou mesmo por outras vias ainda não conhecidas.

2.7.1. Princípios dos Exercícios Aquáticos

Diante dos estudos apresentados, observa-se que as modalidades de exercícios são variáveis, sendo a natação e a corrida as mais comumente aplicadas após desnervação. Porém a natação é uma habilidade inata aos ratos e os estudos realizados utilizando esse modelo revelam a ocorrência de adaptações ao treinamento físico semelhantes às aquelas observadas em humanos, oferecendo uma vantagem sobre a corrida (Gobatto et al., 2001).

A maioria das respostas e adaptações ao exercício na água são qualitativamente semelhante às resultantes do exercício em solo, entretanto existem diferenças quantitativas entre as modalidades que podem afetar a prescrição de programas de atividades recreativas, terapêuticas e reabilitadoras, como os princípios físicos da água (Ruoti et al., 1997; Caromano e Nowotny, 2002).

As forças físicas da água que atuam sobre o corpo provocam alterações fisiológicas extensas, afetando quase todos os sistemas do organismo. Os efeitos fisiológicos podem somar-se aos desencadeados pela prática de exercício físico

na água, tornando as respostas mais complexas (Ruoti et al., 1997; Caromano e Nowotny, 2002).

O conhecimento detalhado dos efeitos da imersão, acompanhada ou não de exercícios físicos e da fisiopatologia, fornece subsídios suficientes para o estabelecimento de objetivos fisioterapêuticos e um plano de tratamento adequado (Campion, 1990; Caromano e Nowotny, 2002).

Para entender os efeitos dos exercícios aquáticos é preciso compreender alguns princípios como: pressão hidrostática, hidrodinâmica e termodinâmica, que atuam sobre o corpo imerso (Caromano e Nowotny, 2002).

A pressão hidrostática é definida como a pressão exercida pela água igualmente distribuída sobre todo o corpo imerso. A pressão aumenta com a densidade do líquido e com a profundidade (Skinner e Thomson, 1985; Becker, 1997). Outras forças, como pressão atmosférica e a força de flutuação, também atuam sobre o corpo e sob ele, respectivamente (Becker, 1997), conforme ilustra a figura 3.

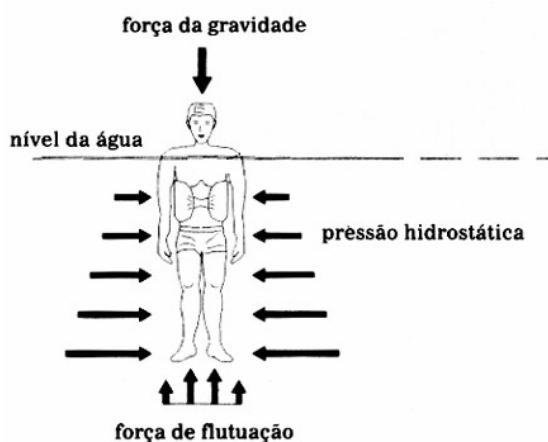


Figura 3 - Corpo em imersão sob a ação da força da gravidade, força de flutuação e pressão hidrostática.
Fonte: Adaptado de Caromano e Nowotny, 2002.

A pressão hidrostática combinada com a pressão atmosférica e a força de flutuação criam uma compressão significativa sobre todos os tecidos do organismo em imersão, reduzindo o edema da região afetada (Ruoti et al., 1997). Outro princípio da água, a viscosidade, que é o atrito interno ente as moléculas, encontra-se aumentada e é de suma importância para o início da reeducação muscular e estimulação sensorial (Skinner e Thomsom, 1985).

A hidrodinâmica está relacionada ao movimento do corpo na água. Este princípio compreende os fluxos laminar (alinhado) e turbulento (desalinhado). No fluxo laminar a velocidade permanece constante dentro de uma corrente de líquido, produzindo um fluxo alinhado e contínuo, caracterizado como camadas de líquidos deslizando uma sobre as outras, sendo que as camadas mais centrais movem-se mais rapidamente e as mais externas permanecem estacionárias. Já no fluxo turbulento a velocidade é maior, provocando um movimento irregular do líquido (Becker, 1997; LeVeau e Lissner, 1997).

Durante o movimento, a resistência é maior no fluxo turbulento. Fisicamente, no fluxo laminar a resistência é proporcional à velocidade e é devida ao atrito entre as camadas do líquido. O fluxo turbulento é proporcional ao quadrado da velocidade, em consequência do atrito entre as moléculas individuais do líquido e entre o líquido e o recipiente. Assim, é mais difícil equilibrar-se ou deslocar-se em um fluxo turbulento que em um fluxo contínuo (Becker, 1997; LeVeau e Lissner, 1997; Bates e Hanson, 1998).

A termodinâmica é a interação entre a temperatura corporal e a temperatura da água. Portanto, se o exercício for realizado em água com temperaturas maiores ou iguais a 35°C, resultam em aumento da temperatura central e fadiga prematura. Já o exercício em temperaturas menores ou iguais a

18°C leva a diminuição da temperatura corporal central e a incapacidade de realizar contração muscular, portanto a temperatura mais indicada para a realização de exercícios aquáticos deve estar entre $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (Bates e Hanson, 1998). A força de flutuação, a maior viscosidade e a condutividade térmica aumentada da água em comparação com o ar, usualmente alteram o gasto energético durante o exercício na água (Ruoti et al., 1997).

Boninsegna et al. (1990), relataram que a temperatura da água influi no gasto energético durante o exercício. Os autores submeteram ratos a 30 minutos de natação em água fria e em água aquecida e observaram que nos animais que nadaram em água fria tiveram seu estoque de glicogênio muscular quase todo depletado, já os animais que nadaram em água aquecida a depleção foi parcial.

Durante o período de imersão, os efeitos fisiológicos são, basicamente, uma elevação geral na temperatura corporal (Ruoti et al., 1997). O corpo ganha calor através das áreas que estão debaixo da água, porém só consegue perdê-lo a partir da vasodilatação cutânea e da secreção das glândulas sudoríparas das regiões que se encontram fora da água. O corpo ganha calor da água a partir da conversão de energia durante o exercício. À medida que a pele se torna aquecida, os vasos sanguíneos superficiais dilatam-se e o suprimento sanguíneo periférico é aumentado, ao mesmo tempo ocorrendo um aumento da frequência cardíaca por essa elevação da temperatura. O calor relativamente fraco da água reduz a sensibilidade das terminações nervosas sensitivas e, assim, o calor da água ajuda a aliviar a dor, além da redução do espasmo muscular (Skinnes e Thomson, 1985; Ruoti et al., 1997).

Considerando os efeitos do exercício em meio aquático, este estudo busca, por meio da aplicação da natação após neurotmesa, contribuir com as discussões

sobre os efeitos do exercício nas alterações morfológicas e fisiológicas do sistema neuromuscular, bem como sua recuperação funcional, trazendo subsídios para discussão da prática clínica.

2. OBJETIVO

Avaliar a influência do exercício de natação sobre as características morfológicas das junções neuromusculares do músculo sóleo e do nervo isquiático regenerado após autoenxerto de nervo, bem como a recuperação funcional nos diferentes tempos de sobrevivência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar – Protocolo 039/2008 (Anexo).

Cinquenta ratos Wistar com idade entre 6 e 7 semanas, pesando entre 198 \pm 12 g, foram selecionados para o estudo e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade Metodista de Piracicaba (FACIS-UNIMEP).

Os animais foram alocados em gaiolas individuais de polietileno, com ventilação adequada, ciclo automático de iluminação claro/escuro de 12 horas, sob temperatura controlada (23 \pm 2^o C) e livre acesso à água e ração peletizada.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: **Controle (C)**: 5 animais foram mantidos em suas gaiolas sem nenhuma intervenção; **Lesão (L)**: 15 animais tiveram o nervo isquiático esquerdo seccionado e retirado, sendo os segmentos proximal e distal à lesão mantidos em seu leito. Este grupo foi subdividido em 3 grupos (n=5), com sobrevida de 4, 8 e 12 semanas, respectivamente; **Autoenxerto de Nervo (E)**: 15 animais tiveram o nervo isquiático esquerdo seccionado e receberam autoenxerto de nervo. Este grupo foi subdividido em 3 grupos (n=5), com sobrevida de 4, 8 e 12 semanas, respectivamente; **Natação (N)**: 15 animais tiveram o nervo isquiático esquerdo seccionado, receberam autoenxerto de nervo e realizaram exercício de natação 24 horas após a lesão. Este grupo foi subdividido em 3 grupos (n=5), com

sobrevida de 4, 8 e 12 semanas, totalizando 20, 40 e 60 sessões de exercício, respectivamente.

4.2. PROTOCOLO DE ADAPTAÇÃO

Os animais do grupo N passaram por um período de adaptação à água antes de iniciar o experimento, com o objetivo de adaptá-los ao futuro protocolo de exercício, reduzindo o estresse, mas sem promover acomodação física. Os animais foram treinados num tanque (Figura 4) com profundidade de 60 cm e capacidade para 500 L, adaptado para ratos, com temperatura mantida a $32 \pm 1^{\circ}$ C, por meio de um aquecedor de aquário, ligado a um termostato (Harri e Kuusela, 1986; Carvalho, 2001; Oliveira et al., 2008). Durante a atividade, a água do tanque foi mantida em profundidade de 40 cm. A adaptação iniciou-se com 20 minutos no primeiro dia, sofrendo acréscimo progressivo de 10 minutos a cada dia, atingindo 60 minutos no quinto dia de natação.



Figura 4 - Tanque com aquecedor (seta) utilizado para a adaptação e treinamento dos animais.

4.3. ÍNDICE FUNCIONAL DO CIÁTICO (IFC)

Inicialmente os animais foram treinados (uma ou duas vezes) a caminhar no dispositivo utilizado para análise funcional da marcha (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982).

Para o registro das pegadas o animal foi colocado em um corredor com acesso a uma caixa escura com dimensões de 42 x 8,2 cm (De Medinacelli, Freed e Waytt, 1982; Bain, Mackinnon e Hunter, 1989), onde foi colocada uma tira de papel sulfite A4 branco para registro das pegadas (Figura 5A). Para isso, as patas pélvicas dos animais foram marcadas com tinta de impressão digital. A seguir, o animal foi posicionado no início do corredor, por onde caminhava em direção ao ambiente escuro, deixando impressas as faces plantares das patas normal e experimental (De Medinacelli, Freed e Waytt, 1982; Varejão et al., 2004), conforme mostra a figura 5B.

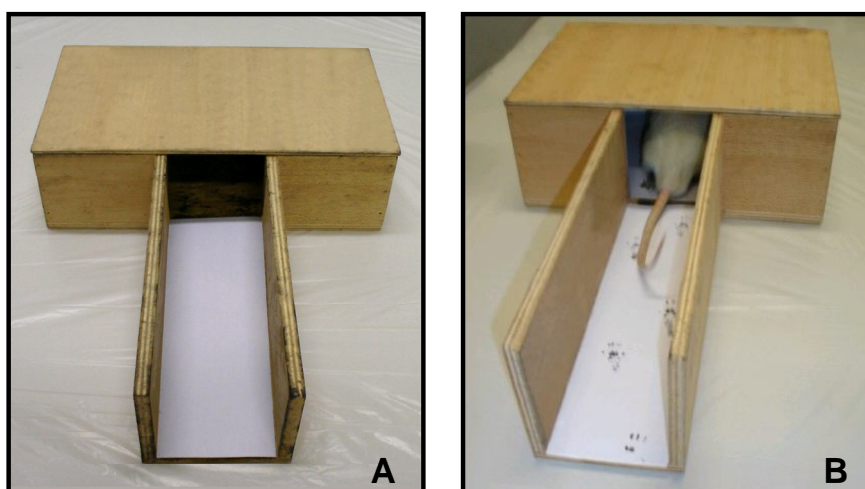


Figura 5 - Aparato de análise da marcha (A); Registro das pegadas (B).

O registro das impressões plantares foi realizado no período pré-operatório em todos os grupos, e utilizado como parâmetro inicial para comparação e avaliação dos registros pós-operatórios (PO) que foram obtidos na 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a, 7^a, 8^a, 9^a, 10^a e 11^a semana pós-operatória (Tetik et al., 2002; Deumens et al., 2007), de acordo com o grupo experimental.

4.4. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para desnervação, os animais foram pesados e posteriormente anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Cetamina (1,16 g/10 mL) e Cloridrato de Xilazina (2 g/100 mL), na proporção de 3:2, em dose de 0,09 mL/100 g e 0,06 mL/100 g de massa corporal, respectivamente.

Após anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos a tricotomia e assepsia da região glútea esquerda. Uma incisão cirúrgica de aproximadamente 2 cm foi realizada sobre a pele, acompanhando o trajeto de projeção do nervo isquiático. Os planos muscular e cutâneo foram afastados permitindo a exposição e o acesso ao nervo (Figura 6A).

Em todos os grupos experimentais o nervo foi cuidadosamente separado do tecido conjuntivo adjacente utilizando-se uma tesoura microcirúrgica (Roca[®]) e um bastão de vidro com ponta curva.

Uma folha de papel milimetrado (Figura 6B) foi posicionada paralelamente ao nervo para padronizar um segmento de 8 mm, que foi seccionado com tesoura microcirúrgica.

No grupo L, o segmento foi retirado e as extremidades distal e proximal mantidas em seu leito. Nos grupos E e N, o nervo isquiático foi seccionado, invertido a 180° e imediatamente fixado aos segmentos proximal e distal por 2 pontos de sutura epineural em cada extremidade, com fio mononylon Ethilon 10-0 – Johnson & Johnson®. Foram mantidos 180° de distância entre cada ponto de sutura, para garantir o adequado acoplamento entre os tecidos (Figura 6C). A manipulação dos segmentos nervosos e do fragmento do enxerto foi delicada, evitando tensão.

Após este procedimento os planos muscular e cutâneo de todos os animais foram suturados com fio de algodão 6-0 ETHICON.

Os animais dos grupos L e E foram mantidos em gaiolas de polietileno, no biotério da FACIS, durante 4, 8 ou 12 semanas, de acordo com o grupo experimental.

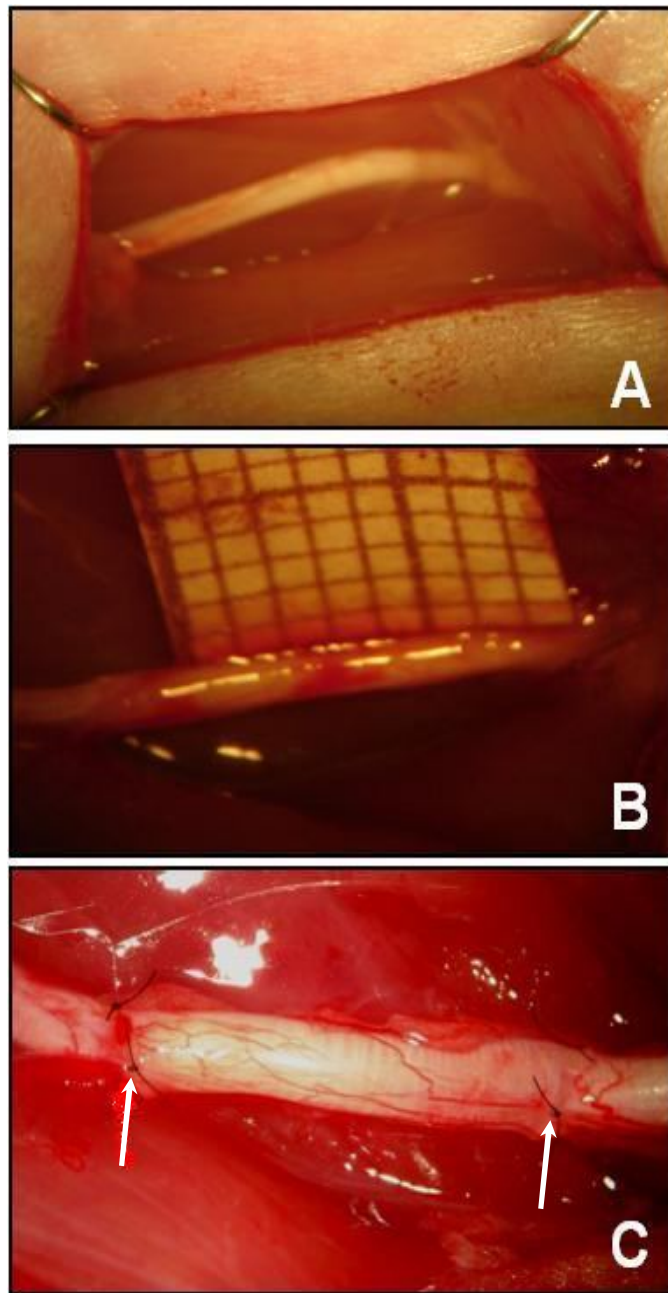


Figura 6 - Afastamento dos planos muscular e cutâneo com exposição do nervo isquiático (A); Folha de papel milimetrado, delimitando o local de secção (B); Sutura do enxerto aos segmentos proximal e distal (C), com destaque para os pontos de sutura (seta).

4.5. PROTOCOLO DE NATAÇÃO

Após 24 horas da lesão nervosa, os animais do grupo N foram submetidos a exercício de natação diária, sem carga adicional, por um período de 4, 8 ou 12 semanas, 30 minutos/dia, 5 vezes por semana, mantendo intervalo de 24 horas entre cada sessão de exercício, realizada sempre no período vespertino. Durante o exercício a profundidade da água mantida no tanque foi de 40 cm (Figura 7).

Os animais eram colocados na água e impulsionados durante todo tempo para evitar o uso de artifícios, como ficar parado ou se apoiar na borda do tanque para descansar durante o exercício, uma vez que, segundo Van Meeteran et al. (1997), estes tendem a nadar energeticamente por 5 a 10 minutos e, em seguida, permanecer em posição de flutuação, mantendo-se imóveis e com a cabeça fora da água.

Os animais foram impulsionados com cuidado para evitar o estresse, visto que a ameaça de afogamento induz alterações fisiológicas, comportamentais e psicológicas negativas na recuperação funcional após lesão (Gutmann e Jakoubek, 1963; Van Meeteren et al., 1997).

Em todas as sessões de exercício foi realizada turbulência na água por meio da agitação manual de um bastão de madeira, exigindo do animal maior controle motor durante a natação.

Após cada sessão de exercício, os animais foram secados com toalhas de pano e com jato de ar quente, produzido por um secador (TAIFF-RS-3[®]), e recolocados nas gaiolas (Oliveira et al., 2008).

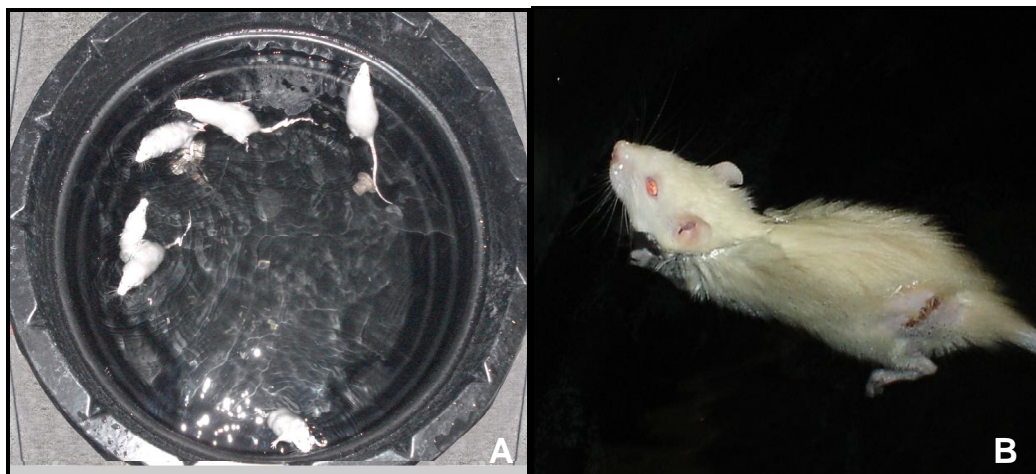


Figura 7 - Animais no tanque durante a natação (A). Destaque para o exercício de natação (B).

4.6. PROCEDIMENTO PARA COLETA DO MATERIAL

Ao atingir os respectivos tempos de sobrevivência, os animais dos 4 grupos foram novamente anestesiados da mesma forma que para a lesão nervosa.

4.6.1 Coleta e Processamento do Músculo Sóleo

Para a análise das junções neuromusculares (JNMs) foi utilizado todo o músculo sóleo, conforme metodologia proposta por Marques et al. (2005).

Após anestesia os animais sofreram perfusão intracardíaca de 20 mL de solução tampão fosfato (PBS), seguida de 20 mL de paraformaldeído a 4%, visando a fixação do tecido muscular antes da retirada do músculo sóleo esquerdo do animal. Em seguida, os músculos foram fixados in situ com

paraformaldeído 4% durante 25 minutos, retirados e fixados pelas extremidades em uma cuba contendo gel Sylgard, com auxílio de alfinetes entomológicos.

Os músculos foram lavados várias vezes com PBS para inativar o fixador e incubados com solução de glicina 0,1 M por 20 minutos em agitador orbital (FANEM 255-B[®]). Após lavagens com PBS, foram incubados com colagenase 1% (Tipo I - Sigma[®]) por 30 minutos no agitador para o desprendimento do tecido conjuntivo restante. A seguir, foram lavados novamente com PBS e os AChRs marcados com α -bungarotoxina conjugada à rodamina (Rh-BTX 1:100 em PBS; Sigma[®]) durante 45 minutos no agitador. Após esse período, os músculos foram lavados com PBS e incubados com Triton X100 1% durante 1 hora, para permeabilização das fibras musculares. Em seguida foram lavados com PBS e incubados em solução bloqueadora (BSA-30%; Triton X-100-6%; Soro fetal bovino-8%; Leite desnatado-2%; Glicina-1%) e deixados a 4^o C overnight. Depois, incubados com anticorpo primário anti-neurofilamento (em solução bloqueadora - Sigma[®]) para marcação dos terminais nervosos e mantidos em geladeira, overnight.

No dia seguinte, foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário anti-mouse (terminais nervosos) em solução bloqueadora durante 3 horas no agitador. Foram lavados com PBS e montados em lâmina sob lamínula em meio de montagem para fluorescência DABCO (Sigma[®]).

4.6.2. Coleta e Processamento do Nervo Isquiático

O nervo isquiático esquerdo dos animais foi exposto e fixado in situ à 4°C durante 10 minutos com fixador de Karnovsky (1965) modificado, contendo 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.3.

A porção distal ao enxerto foi 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, imersa em uranila 5% durante 24 horas, para coloração em bloco, desidratada em soluções crescentes (30% a 100%) de acetona e incluída em resina Araldite (UEGAMA).

Foram obtidos cortes transversais de 1µm com 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 apud Teodori, 1998).

4.7. ANÁLISE DOS DADOS

4.7.1. Análise Morfométrica do Nervo Isquiático

A análise morfométrica foi realizada em sistema analisador de imagens *Image-Pro Plus 6.2 - Media Cybernetics* para obter o número de axônios, a espessura da bainha de mielina, o diâmetro da fibra e do axônio 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.

As imagens dos cortes transversais do nervo isquiático foram captadas em câmera digital Infinity – Lumenera, acoplada a fotomicroscópio OLYMPUS BX 4.1. Foi analisado um corte histológico de cada lâmina, por meio do microscópio óptico, onde a lâmina histológica foi focalizada na objetiva de 10X e de 100X para a observação e captação da imagem pelo sistema e visualização em tempo real na tela do computador. Foram fotografados 5 campos aleatoriamente definidos em cada corte histológico, sendo possível normalizar e congelar as imagens para análise morfométrica.

As medidas foram realizadas de forma semi-automática, sendo cada fibra nervosa mielínica e axônio contornados pelo *mouse* para obter os valores (em micrômetros) referentes ao diâmetro da fibra e diâmetro do axônio, respectivamente. Esses valores foram transferidos para o *Excel*, compondo uma lista de dados.

A seguir, são apresentadas as fórmulas utilizadas para calcular o diâmetro médio dos axônios, diâmetro médio das fibras, espessura média da bainha de mielina e razão G, respectivamente:

$$\text{Diâmetro médio axônios} = \frac{\sum \text{diâmetro axônios}}{N^{\circ} \text{ axônios}}$$

$$\text{Diâmetro médio fibras} = \frac{\sum \text{diâmetro fibras}}{N^{\circ} \text{ fibras}}$$

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

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

4.7.2. Análise Quantitativa das Fibras Nervosas Mielínicas

O número total de fibras nervosas mielínicas foi calculado a partir da somatória do número de axônios obtidos em cada um dos 5 campos no corte transversal do nervo em cada grupo, em objetiva de 100X. Para isso, foi estabelecida a proporção entre este valor e a área total do nervo, obtida em objetiva de 10X. As fórmulas a seguir demonstram como foram calculados a porcentagem da amostra e o número total de axônios em cada nervo (onde * corresponde à multiplicação), respectivamente (Santo Neto et al., 1998):

$$\text{amostra (\%)} = \frac{\sum \text{área dos campos}}{\sum \text{área do nervo}} * 100$$

$$N^{\circ} \text{ total de axônios} = \frac{\sum N^{\circ} \text{ axônios}}{\text{amostra (\%)}} * 100$$

4.7.3. Análise Morfométrica das JNMs do Músculo Sóleo

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TS 100, com câmera de vídeo (Nikon digital câmera DX m1200F), em objetiva de 20x.

Foram analisados o número de terminais nervosos e de receptores de acetilcolina, bem como a porcentagem de mono ou poliinervação das JNMs nas camadas mais superficiais do músculo sóleo.

4.7.4. Análise Funcional da Marcha

Um paquímetro digital (MITUTOYO®) foi utilizado para mensurar a distância entre a extremidade do terceiro dedo e o calcâneo - Comprimento da Pegada (PL); entre o primeiro e o quinto dedo - Largura da Pegada (TS) e entre o segundo e quarto dedo - Largura Intermediária da Pegada (ITS) das patas experimental (E) e normal (N) (Bain, Mackinnon e Hunter, 1989; Varejão et al., 2004), conforme mostra a figura 8.

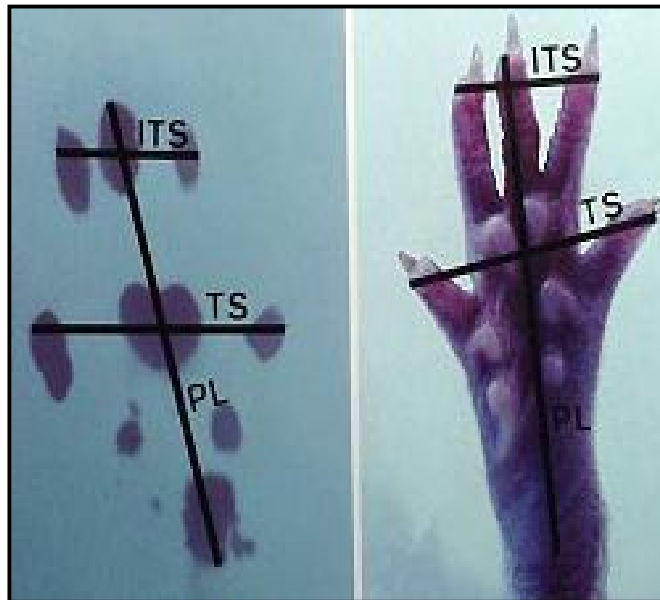


Figura 8 - Parâmetros para mensuração das pegadas.
Fonte: Varejão et al. (2004)

Os valores encontrados foram organizados na fórmula abaixo, definida por Bain, Mackinnon e Hunter (1989):

$$SFI = -38.3 * \frac{(EPL - NPL)}{NPL} + 109.5 * \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + 13.3 * \frac{(EIT - NIT)}{NIT} - 8.8$$

Os dados 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 nervosa. Portanto, quanto mais próximo de 0 (zero) o valor obtido, melhor a função (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982; Bain, Mackinnon e Hunter, 1989).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software utilizado para o tratamento dos dados foi o Statistical Package for Social Science for Personal Computer (SPSS/PC versão 13.0) com nível de significância de 5%.

Para todas as variáveis foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, para analisar o as junções neuromusculares e o número de axônios e os dados morfométricos foi utilizado o teste Anova-F seguido de Tamhane. O Índice Funcional da marcha intragrupos foi analisado por meio do teste Anova-F medidas repetidas, seguido do teste de Bonferroni e, na análise intergrupos, o teste Anova-F seguido de Tamhane.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DOS AXÔNIOS

5.1.1. Características Macroscópicas no Local do Enxerto

Ao observar o local do auto-enxerto de nervo nos grupos Enxerto e Natação, após 4, 8 e 12 semanas, identificou-se facilmente o segmento proximal, o local do enxerto e o segmento distal à lesão, que estavam delimitados pela presença dos pontos de sutura. Além disso, a região do enxerto apresentou-se mais espessada em relação às regiões proximal e distal. No grupo Lesão após 8 e 12 semanas, notou-se maior quantidade de tecido conjuntivo ao redor do nervo e nos tecidos adjacentes, caracterizando a formação de neuroma. Neste grupo também não foi observada reconexão do segmento proximal ao distal, independentemente do período de análise (4, 8 ou 12 semanas).

5.1.2. Análise Histológica dos Nervos

As características histológicas do nervo no grupo Controle mostraram axônios com diâmetros similares e proporcionais às bainhas de mielina, as quais se apresentaram íntegras e com formato regular, portanto compatíveis com nervos normais (Figura 9 - C).

No grupo Lesão observou-se extensa proliferação conjuntiva na região distal à lesão e ausência de axônios (Figura 9 – L4, L8 e L12).

Nos grupos Enxerto e Natação 4 semanas foi observado maior número de axônios na região do enxerto em relação à região distal (Figura 9 – E4E, E4D, N4E e N4D). Os axônios apresentaram-se com menor diâmetro e com formatos irregulares, sendo evidente a presença de tecido conjuntivo perineural, caracterizando a presença de minifascículos. Porém, no grupo Natação (N4E e N4D), foram observados axônios com maior diâmetro e em maior quantidade em relação ao grupo Enxerto.

Nos grupos Enxerto e Natação 8 semanas prevaleceu a presença de axônios de menor diâmetro e espessura de mielina, havendo, aparentemente, tecido conjuntivo perineural em maior quantidade (Figura 9). Mas ao comparar os grupos 4 e 8 semanas, nota-se um aumento do número e diâmetro axonal após 8 semanas.

Finalmente, nos grupos Enxerto e Natação 12 semanas, nota-se um predomínio de axônios de maior diâmetro e em maior número em relação aos grupos 4 e 8 semanas (Figura 9). O grupo Natação 12 semanas apresentou axônios com formato regular e espessura de bainhas de mielina proporcional ao diâmetro axonal.

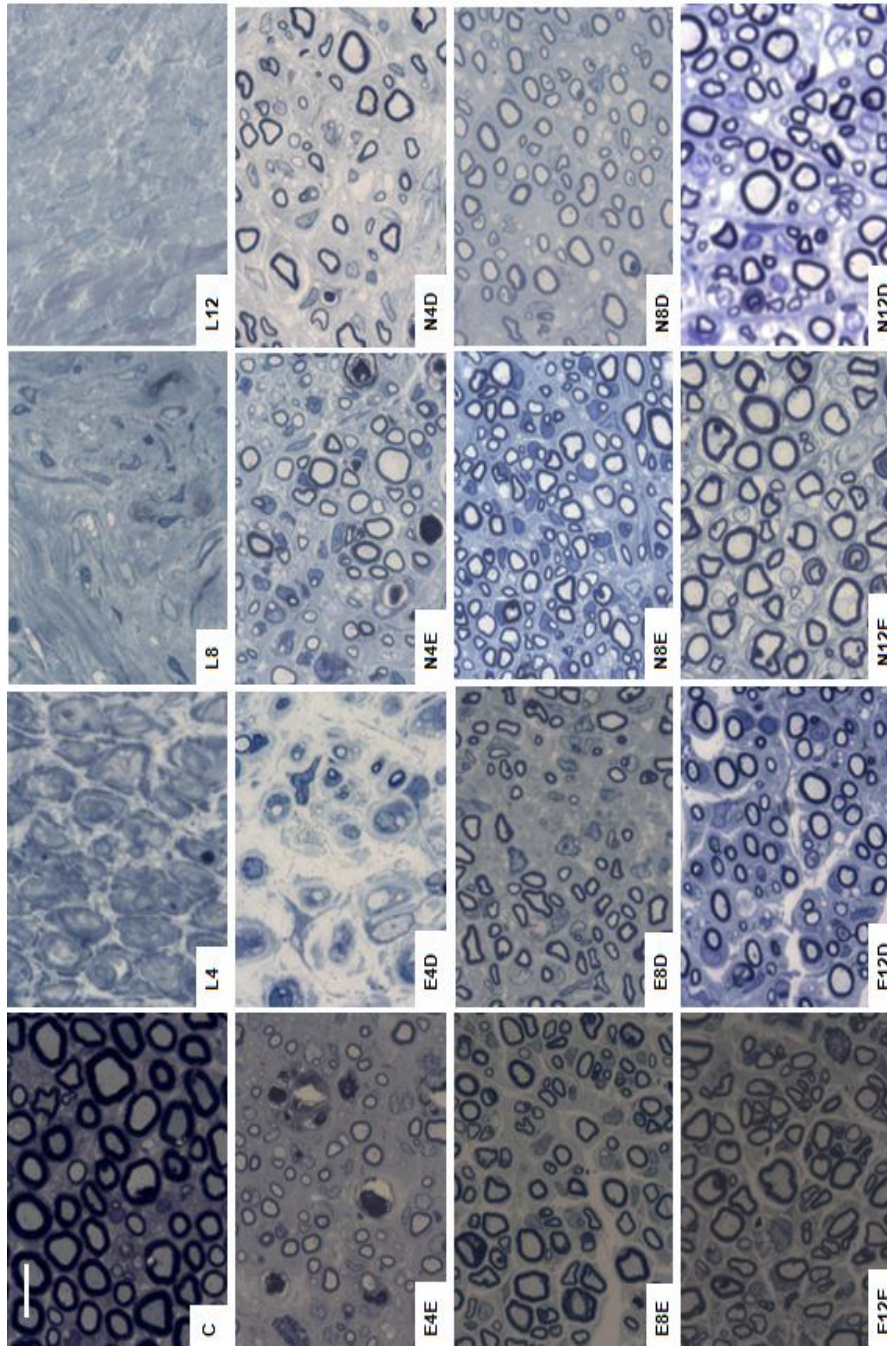


Figura 9 - Fotomicrografia de cortes transversais do nervo isquiático dos grupos: Controle (C), Lesão 4 (L4), Lesão 8 (L8); Lesão 12 (L12); Enxerto 4 região do enxerto (E4E); Enxerto 4 região distal (E4D); Natação 4 região do enxerto (N4E); Natação 4 região distal (N4D); Enxerto 8 região do enxerto (E8E); Enxerto 8 região distal (E8D); Natação 8 região do enxerto (N8E); Natação 8 região distal (N8D); Enxerto 12 região do enxerto (E4E); Enxerto 12 região distal (E4D); Natação 12 região do enxerto (N12E); Natação 12 região distal (N12D). Coloração: Azul de Toluidina. Barra 10µm.

5.1.3. Análise Morfométrica das Fibras Nervosas Mielínicas

Nas tabelas abaixo não foram apresentados os dados morfométricos do Grupo Lesão devido à ausência de axônios.

O grupo Controle apresentou maior diâmetro de axônios e fibras nervosas em relação aos grupos Enxerto e Natação após 4 semanas, tanto na região do enxerto quanto na região distal. No grupo Enxerto foi observado menor diâmetro de axônios e fibras na região distal em relação ao grupo Natação, na mesma região. A espessura da bainha de mielina do grupo Enxerto na região do enxerto e distal e grupo Natação na região distal apresentou-se menor que a observada no grupo Controle ($p < 0,05$), conforme tabela 1. Não se observou diferença nos valores de Razão G entre os grupos.

Tabela 1 – Valores de média \pm DP do diâmetro do Axônio (\varnothing Axônio), do diâmetro da fibra (\varnothing Fibra), espessura da bainha de mielina e razão G, dos grupos Controle, Enxerto e Natação 4 semanas na região do enxerto e distal. (*) difere do Controle; (#) difere N4D ($p < 0,05$).

Grupos	\varnothing Axônio (μm)	\varnothing Fibra (μm)	Esp. Mielina	Razão G
Controle	6,36 \pm 0,39	10,14 \pm 0,37	1,89 \pm 0,14	0,63 \pm 0,02
E4E	3,42 \pm 0,26 *	5,81 \pm 0,14 *	1,20 \pm 0,14 *	0,59 \pm 0,04
E4D	2,11 \pm 0,38 *#	3,38 \pm 0,54 * #	0,64 \pm 0,08 *	0,62 \pm 0,01
N4E	3,86 \pm 0,62 *	7,10 \pm 0,63 *	1,62 \pm 0,45	0,55 \pm 0,10
N4D	3,38 \pm 0,19 *	5,58 \pm 0,27 *	1,10 \pm 0,10 *	0,61 \pm 0,02

Após 8 semanas observou-se redução no diâmetro do axônio e da fibra nervosa nos grupos Enxerto e Natação, tanto na região do enxerto quanto na região distal, em relação ao grupo Controle. A espessura da bainha de mielina apresentou-se menor nos grupos Enxerto e Natação na região do enxerto em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$), conforme a tabela 2. Não foi observada diferença nos valores de Razão G entre os grupos.

Tabela 2 – Valores de média \pm DP do diâmetro do Axônio (\varnothing Axônio), do diâmetro da fibra (\varnothing Fibra), espessura da bainha de mielina e razão G, dos grupos Controle, Enxerto e Natação 8 semanas na região do enxerto e distal. (*) difere do Controle ($p < 0,05$).

Grupos	\varnothing Axônio (μm)	\varnothing Fibra (μm)	Esp. Mielina	Razão G
Controle	6,36 \pm 0,39	10,14 \pm 0,37	1,89 \pm 0,14	0,63 \pm 0,02
E8E	3,70 \pm 0,50 *	6,11 \pm 0,36 *	1,20 \pm 0,08 *	0,60 \pm 0,04
E8D	3,29 \pm 0,34 *	6,21 \pm 0,55 *	1,46 \pm 0,24	0,53 \pm 0,04
N8E	4,24 \pm 0,37 *	6,58 \pm 0,20 *	1,19 \pm 0,17 *	0,64 \pm 0,05
N8D	3,30 \pm 0,33 *	6,93 \pm 0,21 *	1,63 \pm 0,20	0,52 \pm 0,05

Após 12 semanas houve redução no diâmetro do axônio e da fibra nervosa do grupo Enxerto na região do enxerto e distal em relação ao grupo Controle. O grupo Enxerto, na região do enxerto e na região distal, tiveram uma redução no diâmetro da fibra em relação ao grupo Natação na região do enxerto e na região distal, respectivamente. No grupo Enxerto, na região do enxerto, foi observado redução na espessura da bainha de mielina em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$), conforme a tabela 3. Não foi observada diferença nos valores de Razão G entre os grupos.

Tabela 3 – Valores de média± DP do diâmetro do Axônio (\varnothing Axônio), do diâmetro da fibra (\varnothing Fibra), espessura da bainha de mielina e razão G, dos grupos Controle, Enxerto e Natação 12 semanas na região do enxerto e distal. (*) difere do Controle; (#) difere N12E; (†) difere N12D ($p < 0,05$).

Grupos	\varnothing Axônio (μm)	\varnothing Fibra (μm)	Esp. Mielina	Razão G
Controle	6,36±0,39	10,14±0,37	1,89±0,14	0,63±0,02
E12E	4,21±0,15 *	6,29±0,31 *#	1,24±0,14 *	0,63±0,03
E12D	3,68±0,45 *	6,38±0,19 *†	1,41±0,28	0,56±0,08
N12E	5,83±0,70	8,13±0,10	1,46±0,39	0,67±0,08
N12D	5,18±0,34	8,31±0,24	1,35±0,38	0,66±0,07

5.1.4 Análise Quantitativa das Fibras Nervosas Mielínicas

Na comparação entre as regiões do enxerto (RE) e distal (RD) ao enxerto foi encontrada diferença significativa nos grupos Natação 4 ($p=0,02$), Natação 8 ($p=0,03$) e Enxerto 12 ($p=0,01$) semanas. Nos demais grupos não houve diferença entre a região do enxerto e distal do nervo (Tabela 4). Nos grupos Lesão não se observou axônios, nos diferentes períodos de análise.

Tabela 4 - Valores de média \pm DP do número de fibras mielínicas da região do enxerto (RE) e distal (RD) nos diferentes grupos experimentais. (*) difere do respectivo RE. RE (região do enxerto); RD (região distal).

Grupos	Número de Fibras Mielínicas	
	RE	RD
Controle	7867 \pm 1782	-
L4	0	0
E4	5948 \pm 1367	640 \pm 176
N4	5436 \pm 932	2300 \pm 452*
L8	0	0
E8	11072 \pm 508	9504 \pm 2036
N8	16160 \pm 3252	13112 \pm 1941*
L12	0	0
E12	14264 \pm 3326	11304 \pm 2428*
N12	12880 \pm 699	11112 \pm 441

Ao comparar os grupos Lesão, Enxerto e Natação 4 semanas, observou-se redução significativa do número de axônios na região distal dos grupos Enxerto e Natação em relação ao grupo Controle (Figura 10). O grupo Natação 4 semanas apresentou maior número de axônios na região distal ao ser comparado com o grupo Enxerto 4 semanas, também na região distal ($p < 0,05$).

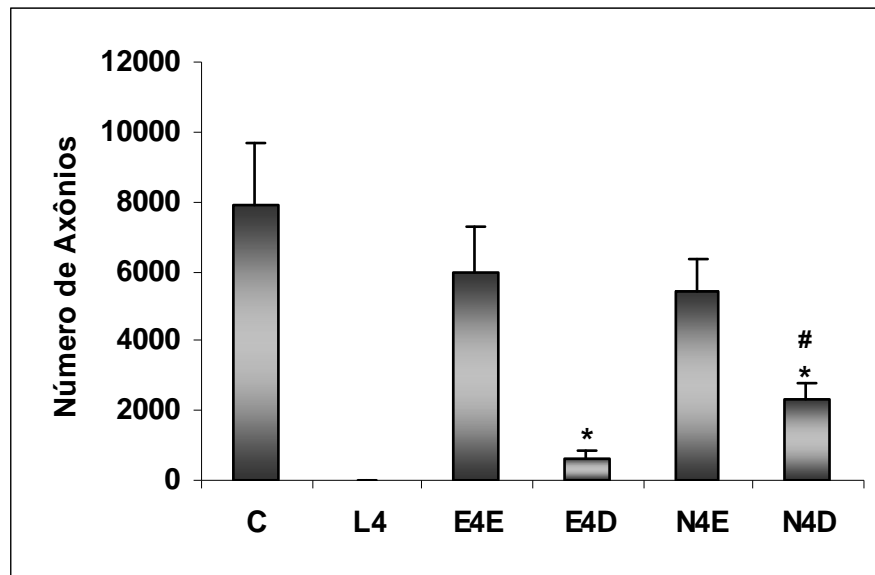


Figura 10 - Valores de média \pm DP da comparação intragrupo do número de axônios dos grupos, Controle (C), Lesão (L4), Enxerto (E4) e Natação (N4), nas regiões do enxerto e distal. (*) difere do C; (#) difere do E4D.

No grupo Natação 8 semanas observou-se aumento significativo no número de axônios, tanto na região do enxerto quanto na distal, comparado ao grupo Controle (Figura 11). Na comparação entre o grupo Natação e Enxerto 8 semanas foi encontrado aumento significativo de axônios na região do enxerto no grupo natação, bem como de sua região distal ($p < 0,05$).

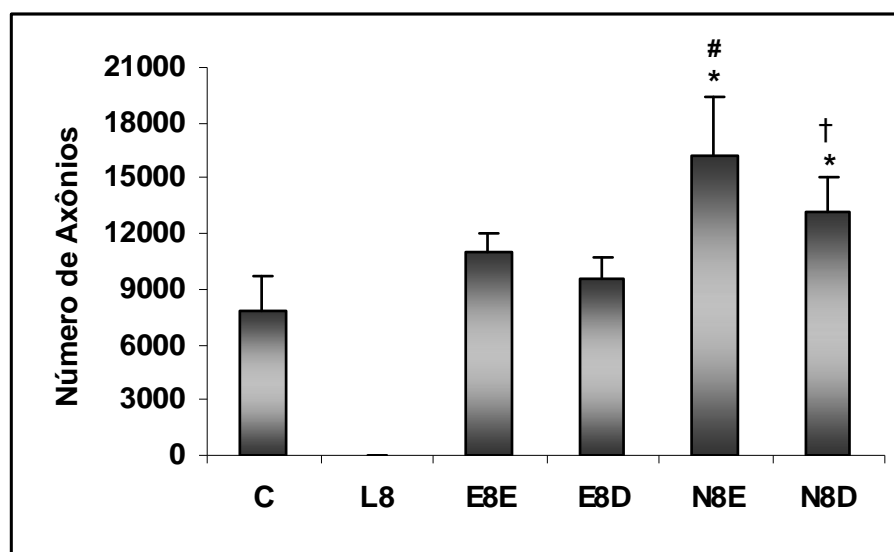


Figura 11 - Valores de média \pm DP da comparação intragrupo do número de axônios dos grupos, Controle (C), Lesão (L8), Enxerto (E8) e Natação (N8), nas regiões do enxerto e distal. (*) difere do C; (#) difere do E8E; (†) difere do E8D.

O número de axônios dos grupos 12 semanas apresentou-se aumentado em todos os grupos em relação ao controle, nas diferentes regiões do nervo analisadas (Figura 12), não havendo diferença entre os demais grupos ($p < 0,05$).

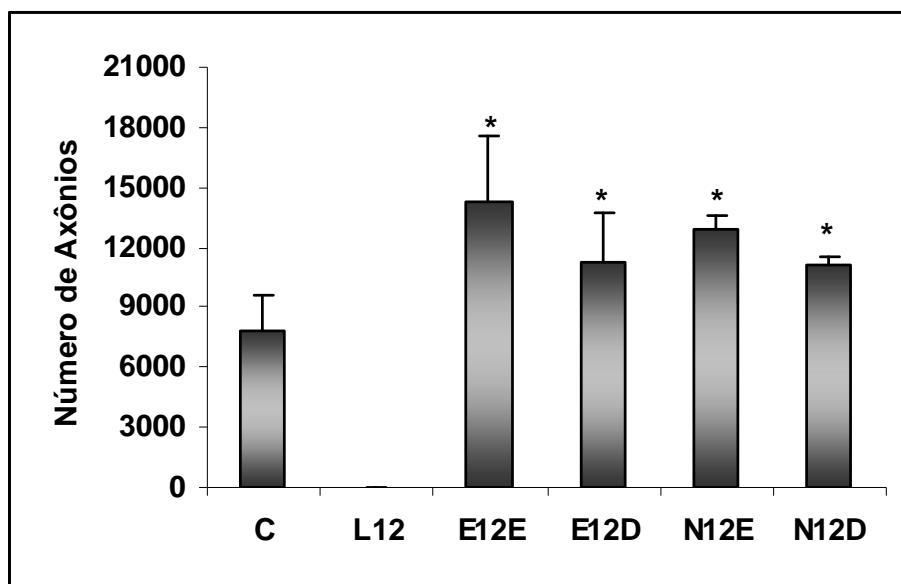


Figura 12 - Valores de média \pm DP da comparação intragrupo do número de axônios dos grupos: Controle (C), Lesão (L12), Enxerto (E12) e Natação (N12), nas regiões do enxerto e distal. (*) difere do C.

5.2. JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

5.2.1. Análise Histológica das Junções Neuromusculares

Ao analisar a Figura 13, pode-se observar que no grupo C, os receptores de acetilcolina estão monoinervados. Nos grupos L4, E4, L8 e L12 semanas foram observados receptores de acetilcolina aparentemente em maior número e ausência de terminais nervosos. Nos grupos N4 e E8 semanas identificou-se receptores de acetilcolina poliinervados, já nos grupos N8, E12 e N12 os receptores apresentaram-se monoinervados.

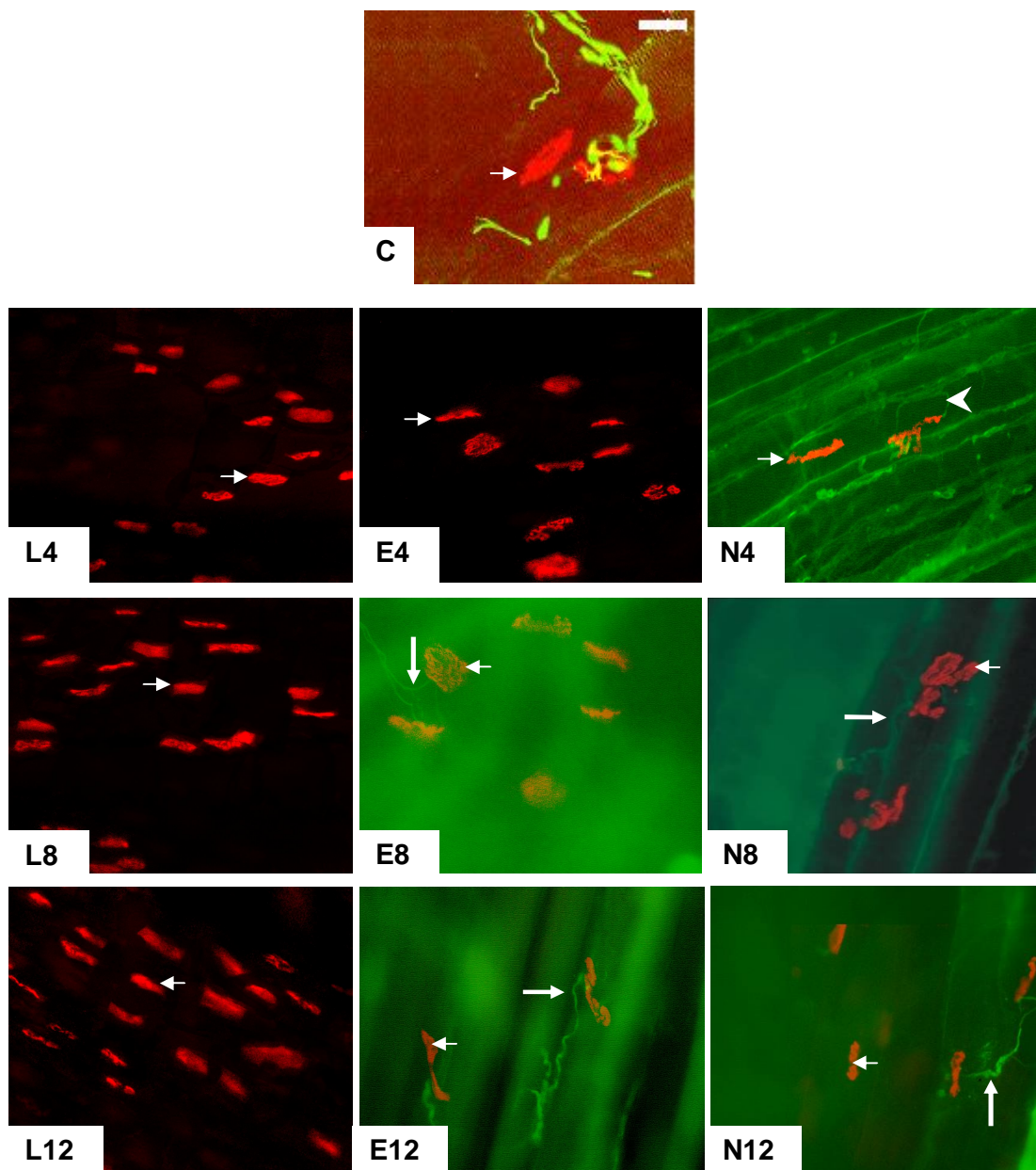


Figura 13 - Fotomicrografia do músculo sóleo dos grupos: Controle (C), Lesão 4 (L4), Enxerto 4 (E4), Natação 4 (N4), Lesão 8 (L8), Enxerto 8 (E8), Natação 8 (N8), Lesão 12 (L12), Enxerto 12 (E12) e Natação 12 (N12). Observar receptores de ACh (seta curta), monoinervação (seta longa), poliinervação (cabeça de seta). Barra 20 μ m.

5.2.2. Quantificação dos Receptores de Acetilcolina

Ao comparar os grupos Controle, Lesão Enxerto e Natação, não se observou diferença no número de receptores de acetilcolina dos grupos 4 (Figura 14) e 8 (Figura 15) semanas, considerando o número total de receptores, receptores inervados e desnervados ($p>0,05$).

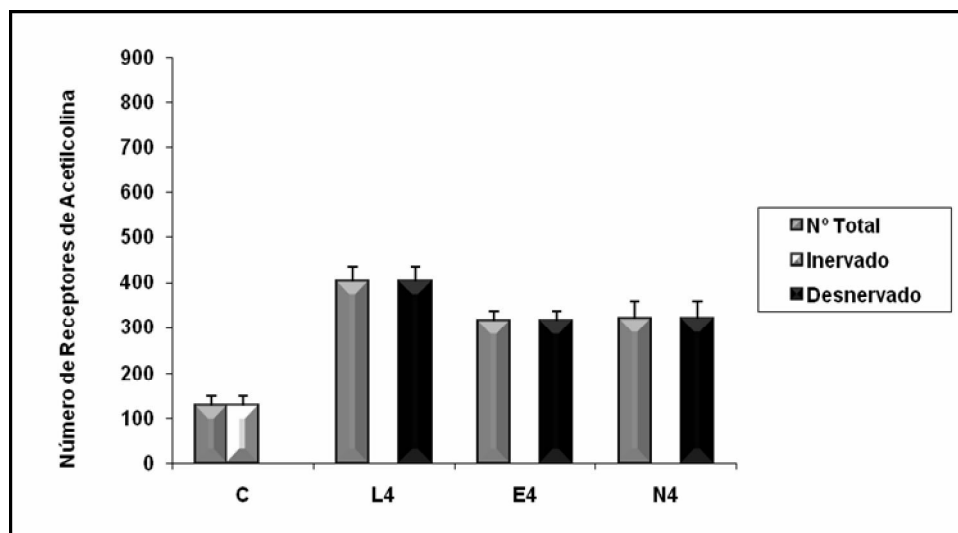


Figura 14 - Valores médios do número total de receptores de acetilcolina, receptores inervados e desnervados dos grupos: Controle (C), Lesão (L4), Enxerto (E4) e Natação (N4); ($p>0,05$).

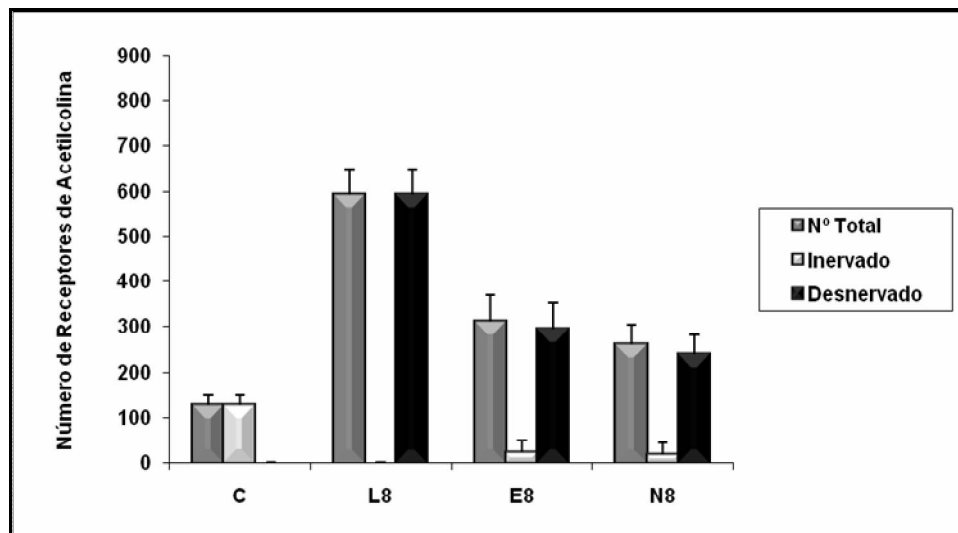


Figura 15 - Valores médios do número total de receptores de acetilcolina, receptores inervados e desnervados dos grupos: Controle (C), Lesão (L8), Enxerto (E8) e Natação (N8); ($p > 0,05$).

Após 12 semanas, o número total de receptores de acetilcolina encontrados no grupo Lesão foi maior que o número observado nos grupos Controle, Enxerto e Natação (Figura 16). O número de receptores de acetilcolina desnervados do grupo Lesão também foi significativamente maior que o encontrado nos grupos Enxerto e Natação ($p < 0,05$).

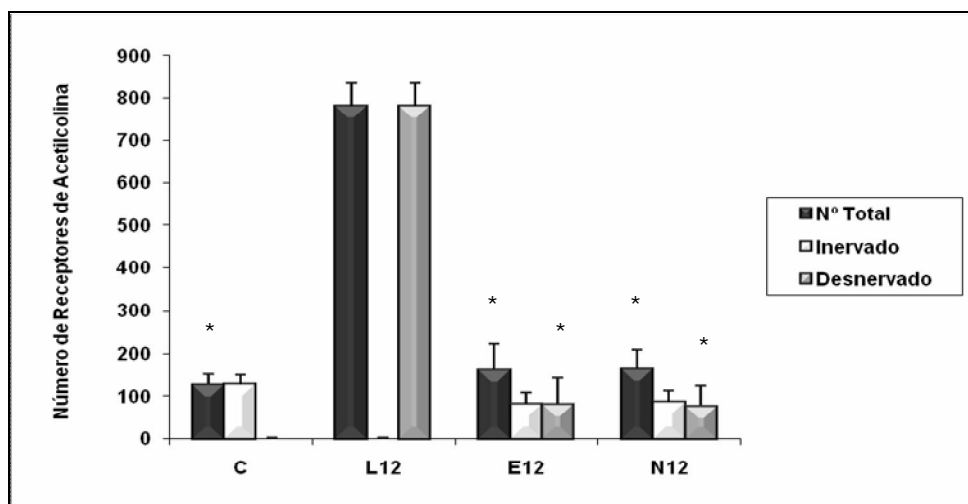


Figura 16 - Valores médios \pm DP do número total de receptores de acetilcolina, receptores inervados e desnervados dos grupos: Controle (C), Lesão (L12), Enxerto (E12) e Natação (N12); (*) difere dos respectivos valores no grupo L12. ($p < 0,05$).

5.2.3. Quantificação das JNMs

Após 4 semanas da lesão, não foram encontradas JNM inervadas nos grupos Lesão e Enxerto, enquanto nos grupos Natação e Controle, observou-se maior número de JNM. Por outro lado, o grupo Natação apresentou número significativamente maior de JNMs em relação ao grupo Enxerto. Foram encontrados receptores de acetilcolina mono-inervados somente no grupo Controle, que foi estatisticamente maior que os demais. O grupo Natação foi o único a apresentar poli-inervação, diferindo dos demais grupos, conforme mostra a Tabela 5. Foram consideradas somente as junções inervadas para mensuração.

Tabela 5 - Número médio de Junções Neuromusculares (Nº JNM), e porcentagem de Monoinervação (Mono) e Poliinervação (Poli) nos grupos: Controle (C), Lesão (L4), Enxerto (E4) e Natação (N4) após 4 semanas da lesão. (*) difere dos demais grupos; (#)

Grupos	Nº JNM	Monoinervação	Poliinervação
C	32 *	100% *	0 †
L4	0	0	0 †
E4	0	0	0 †
N4	14 #	0	100%

Após 8 semanas da lesão, o grupo controle apresentou número de JNM maior que o encontrado no grupo Lesão, porém significativamente menor que o grupo Enxerto. Nos grupos Enxerto e Natação o número de JNM foi estatisticamente maior que o grupo Lesão. O grupo Enxerto também apresentou aumento no número de JNM em relação ao grupo Natação.

Quanto aos receptores de acetilcolina, no grupo Controle todos os receptores estavam monoinervados após 8 semanas, o que o diferenciou dos demais grupos. No grupo Lesão, nenhum receptor estava monoinervado, sendo os valores significativamente menores que nos grupos Controle, Enxerto e Natação. A poliinervação não foi observada nos grupos Controle e Lesão, o que os diferencia estatisticamente dos grupos Enxerto e Natação ($p < 0,05$). Esses resultados estão apontados na tabela 6.

Tabela 6 - Número médio de Junções Neuromusculares (Nº JNM), e porcentagem de Monoinervação (Mono) e Poliinervação (Poli) nos grupos: Controle (C), Lesão (L8), Enxerto (E8) e Natação (N8) após 8 semanas da lesão. (*) difere dos demais grupos; (#) difere do L8; (†) difere N8; (**) difere do E8 ($p < 0,05$).

Grupos	Nº JNM	Monoinervação	Poliinervação
C	32 *	100% *	0 † **
L8	0	0	0 † **
E8	49 # †	24% #	76%
N8	26 #	38% #	62%

Após 12 semanas da lesão nervosa, o número de JNM no grupo Controle foi maior que o encontrado no grupo Lesão, porém, menor que o encontrado no grupo Enxerto. Nos grupos Controle e Natação, a monoinervação foi maior quando comparados ao grupo Lesão. Poliinervação não foi observada nos grupos Controle e Lesão, diferindo-os dos grupos Enxerto e Natação. Ao comparar os grupos Enxerto e Natação, observou-se redução significativa na poliinervação no grupo Natação ($p < 0,05$), conforme mostra a tabela 7.

Tabela 7 - Número médio de Junções Neuromusculares (Nº JNM), e porcentagem de Monoinervação (Mono) e Poliinervação (Poli) nos grupos: Controle (C), Lesão (L12), Enxerto (E12) e Natação (N12) 12 semanas. (*) difere do L12; (#) difere do E12; (†) difere do N12 ($p < 0,05$).

Grupos	Nº JNM	Monoinervação	Poliinervação
C	32 *#	100% *	0 #†
L12	0 #†	0	0 #†
E12	42	56%	44%
N12	38	87% *	13% #

As figuras abaixo apresentam a relação entre o número de receptores de acetilcolina e das junções neuromusculares nos grupos 4 semanas (Figura 17), 8 semanas (Figura 18) e 12 semanas (Figura 19).

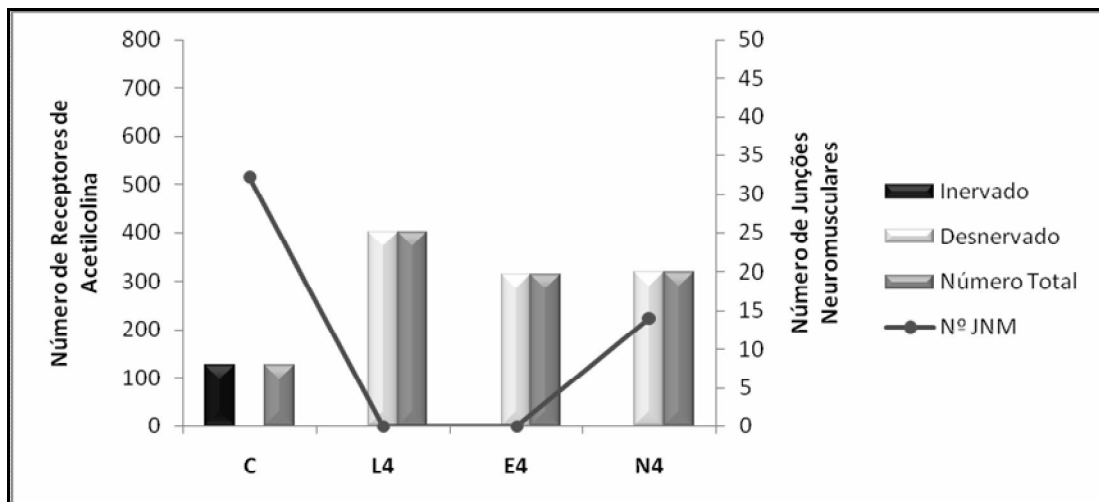


Figura 17 - Relação entre o número de receptores de acetilcolina e as junções neuromusculares dos grupos: Controle (C), Lesão 4 semanas (L4), Enxerto 4 semanas e Natação 4 semanas.

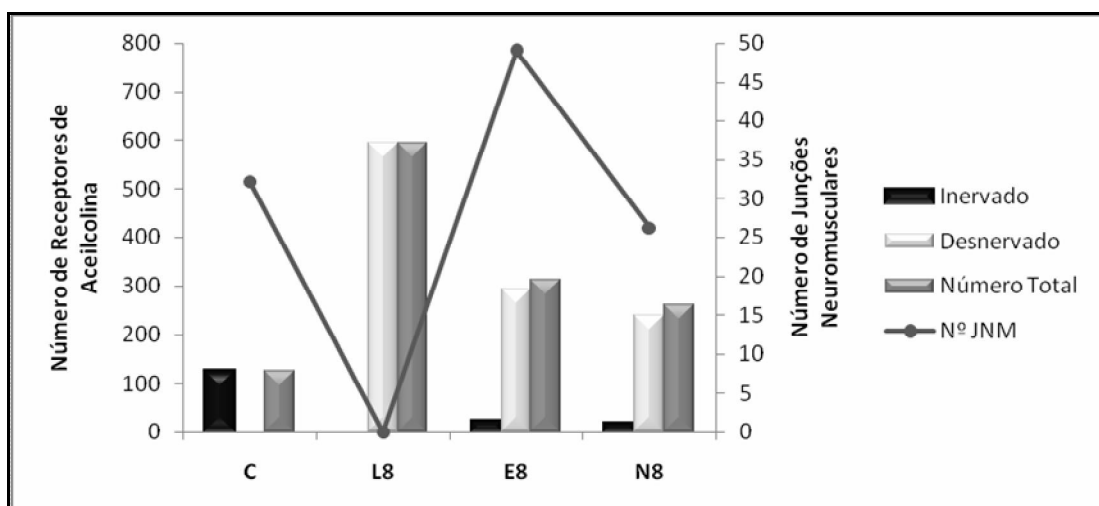


Figura 18 - Relação entre o número de receptores de acetilcolina e as junções neuromusculares dos grupos: Controle (C), Lesão 8 semanas (L8), Enxerto 8 semanas e Natação 8 semanas.

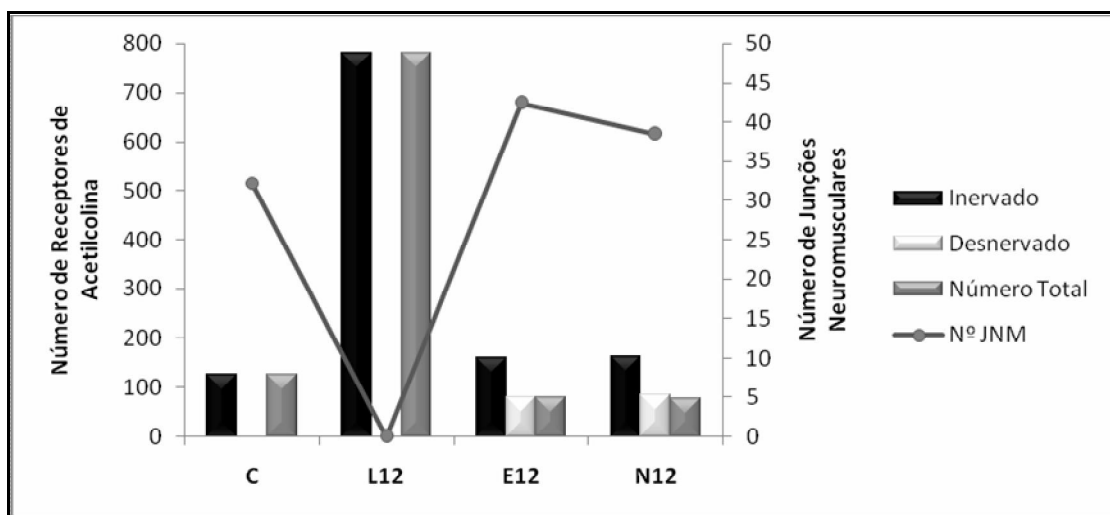


Figura 19 - Relação entre o número de receptores de acetilcolina e as junções neuromusculares dos grupos: Controle (C), Lesão 12 semanas (L12), Enxerto 12 semanas e Natação 12 semanas.

5.3. ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA

5.3.1. Análise Intergrupos

Nos grupos Lesão, Enxerto e Natação 4 semanas, o padrão funcional do IFC foi semelhante nos diferentes tempos de análise. No período pré-operatório todos os grupos apresentaram valores entre 0 e -20, indicando função normal. Já nos demais períodos, os valores permaneceram entre -100 e -80, demonstrando perda de função em todos os grupos (Figura 20). Desta forma não foi observada diferença estatística na análise intergrupos 4 semanas ($p > 0,05$).

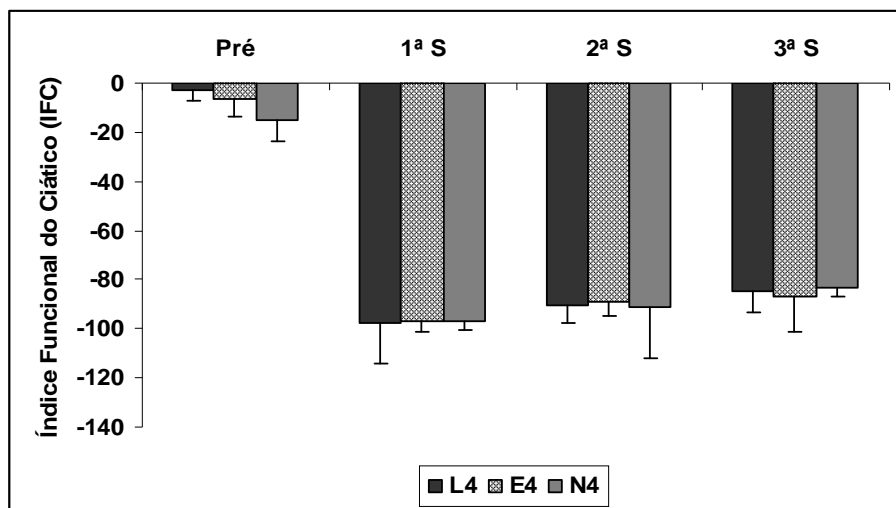


Figura 20 - Valores médios \pm DP da comparação intergrupos do Índice Funcional do Ciático (IFC) dos grupos: Lesão (L4), Enxerto (E4) e Natação (N4) 4 semanas, nos diferentes intervalos de análise ($p > 0,05$).

O IFC dos grupos Lesão, Enxerto e Natação 8 semanas, permaneceu dentro do padrão normal (0 e -20) no período pré-operatório. Após a lesão os valores indicaram perda funcional. Entre a 1ª e a 5ª semana pós-operatória os grupos se comportaram de forma semelhante, com IFC entre -100 e -80. A partir da 6ª e 7ª semana o grupo natação apresentou melhora da função, atingindo valores entre -80 e -70, enquanto no grupo lesão, foram observados valores ainda menores, indicando perda progressiva da função (Figura 21), porém, não houve diferença estatística na análise intergrupos ($p > 0,05$).

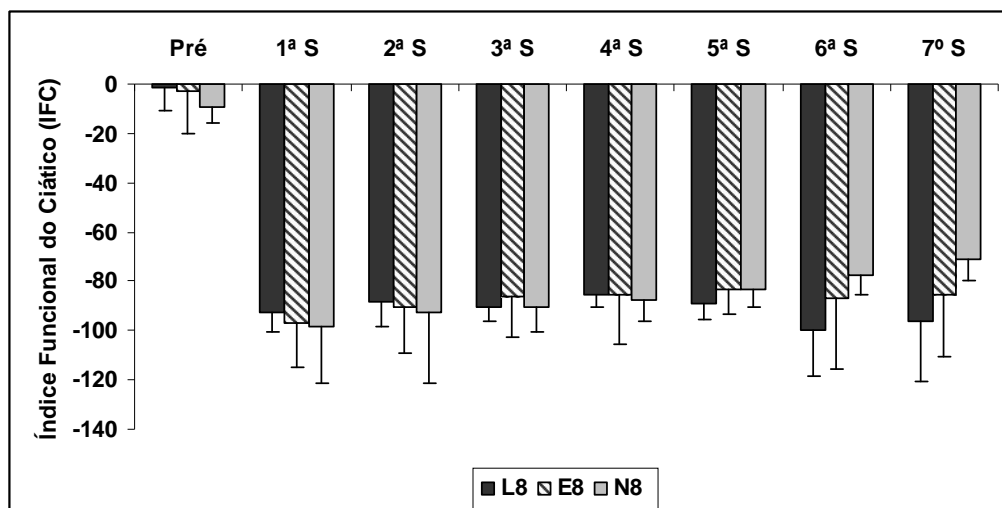


Figura 21 - Valores médios \pm DP da comparação intergrupos do Índice Funcional do Ciático (IFC) dos grupos: Lesão (L8), Enxerto (E8) e Natação (N8) 8 semanas, nos diferentes intervalos de análise ($p > 0,05$).

Os grupos Lesão, Enxerto e Natação 12 semanas também apresentaram função normal, com valores entre 0 e -20 no período pré-operatório. Após a lesão os valores do IFC demonstraram perda de função, porém, ao longo das semanas, o grupo lesão apresentou valores ainda mais negativos, indicando perda crescente de função sensório-motora. Os valores dos grupos Enxerto e Natação tornaram-se progressivamente mais positivos. Da 8ª a 11ª semana o IFC do grupo lesão foi significativamente mais negativo que nos grupos enxerto e natação ($p < 0,05$). No grupo Natação os valores do IFC foram significativamente mais positivos que os valores encontrados no grupo enxerto na 10ª e 11ª semanas PO ($p < 0,05$), conforme mostra a figura 22.

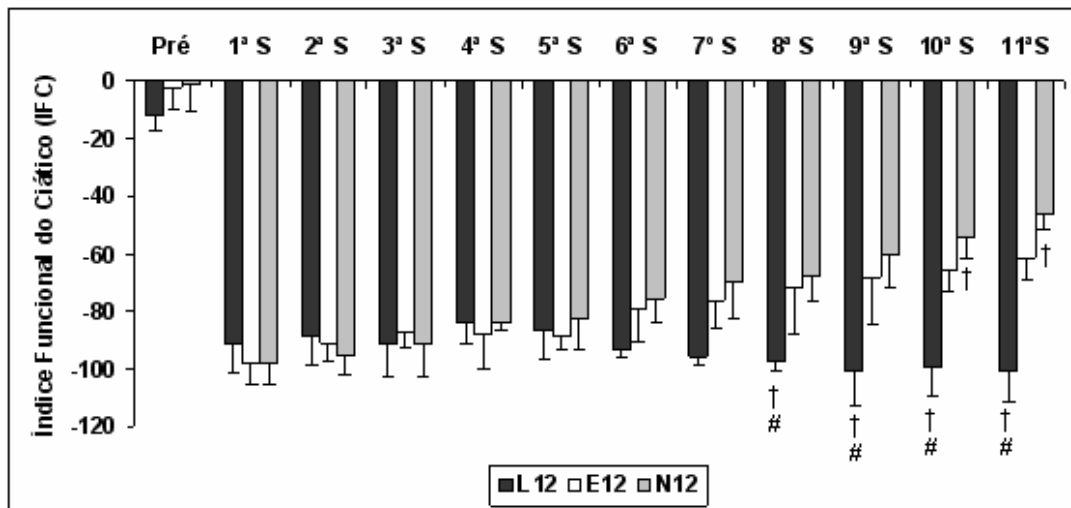


Figura 22 - Valores médios \pm DP da comparação intergrupos do Índice Funcional do Ciático (IFC) dos grupos: Lesão (L12), Enxerto (E12) e Natação (N12) após 12 semanas da lesão, nos diferentes intervalos de análise. † difere do grupo enxerto; # difere do grupo natação ($p < 0,05$).

5.3.2. Análise Intragrupo

Na análise funcional intragrupo foi observada diferença somente entre o período pré-operatório e os demais períodos nos grupos lesão, enxerto e natação 4 (Tabela 8) e 8 semanas (Tabela 9) ($p < 0,05$), porém não houve diferença nos demais períodos.

Tabela 8 - Valores de Média \pm DP do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos grupos: Lesão, Enxerto e Natação 4 semanas nos diferentes períodos de análise; (*) difere do período pré-operatório ($p < 0,05$).

Semana	L4	E4	N4
Pré	-3.22 \pm 4.27	-6.47 \pm 7.18	-14.77 \pm 9.21
1	-97.86 \pm 16.61*	-96.58 \pm 4.42*	-97.09 \pm 3.59*
2	-90.12 \pm 7.53*	-89.23 \pm 5.54*	-91.15 \pm 20.66*
3	-84.92 \pm 8.15*	-86.81 \pm 14.11*	-83.13 \pm 3.55*

Tabela 9 - Valores de Média \pm DP do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos grupos: Lesão, Enxerto e Natação 8 semanas, nos diferentes períodos de análise; (*) difere do período pré-operatório ($p < 0,05$).

Semana	L8	E8	N8
Pré	-1.16 \pm 9.92	-3.10 \pm 17.12	-9.13 \pm 6.76
1	-92.52 \pm 8.34*	-96.97 \pm 18.11*	-108.71 \pm 22.49*
2	-88.35 \pm 10.01*	-85.67 \pm 18.14*	-98.69 \pm 28.66*
3	-90.76 \pm 5.44*	-84.25 \pm 16.39*	-90.33 \pm 10.47*
4	-85.45 \pm 4.78*	-84.15 \pm 20.66*	-87.68 \pm 8.38*
5	-88.90 \pm 6.92*	-83.58 \pm 9.45*	-83.11 \pm 7.34*
6	-99.46 \pm 18.92*	-86.53 \pm 28.95*	-77.76 \pm 7.65*
7	-96.10 \pm 24.26*	-85.27 \pm 25.16*	-71.40 \pm 8.61*

Nos grupos lesão, enxerto e natação 12 semanas, observou-se diferença estatística entre o período pré-operatório e os demais períodos nos grupos L12, E12 e N12 semanas (Tabela 10). Entretanto, no grupo N12 os valores encontrados na 9^a, 10^a e 11^a semana PO foram significativamente maiores que os

encontrados na 1ª semana. A 11ª semana apresentou valores estatisticamente maiores quando comparados a 1ª, 2ª e 3ª semana PO ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Valores de Média \pm DP do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos grupos: Lesão, Enxerto e Natação 12 semanas nos diferentes períodos de análise; (*) difere do período pré-operatório; (†) da 11ª semana pós-operatória; (#) difere da 1ª semana pós-operatória ($p < 0,05$).

Semana	L12	E12	N12
Pré	-12.61 \pm 4.7	-2.18 \pm 7.68	-1.12 \pm 9.09
1	-91.50 \pm 9.91*	-97.92 \pm 7.08*	-97.92 \pm 7.08*†
2	-88.55 \pm 9.74*	-90.92 \pm 6.26*	-95.24 \pm 7.0*†
3	-91.93 \pm 11.03*	-87.32 \pm 5.63*	-91.33 \pm 21.42*†
4	-84.24 \pm 7.71*	-87.70 \pm 12.59*	-84.37 \pm 2.29*
5	-86.55 \pm 9.77*	-88.50 \pm 4.95*	-82.62 \pm 31.0*
6	-93.28 \pm 2.81*	-71.52 \pm 10.93*	-79.59 \pm 8.29*
7	-96.09 \pm 2.65*	-75.56 \pm 26.67*	-70.15 \pm 12.12*
8	-97.02 \pm 4.12*	-69.22 \pm 35.99*	-67.99 \pm 8.87*
9	-100.69 \pm 30.19*	-70.50 \pm 36.38*	-60.28 \pm 11.89*#
10	-99.99 \pm 30.30*	-74.87 \pm 7.66*	-54.34 \pm 7.21*#
11	-101.06 \pm 18.62*	-70.61 \pm 8.22*	-46.43 \pm 5.50*#

6. DISCUSSÃO

6.1. REGENERAÇÃO AXONAL

Estudos relatam o uso de diferentes formas de intervenção cirúrgica com o objetivo de favorecer a regeneração axonal após neurotmesa (Gama, 2000; Verdú et al., 2000; Yavuzer et al., 2002; Tetik et al., 2002; Sunderland et al., 2004). Adicionalmente, a Fisioterapia dispõe de diversos recursos que podem influenciar na maturação dos axônios regenerados (Fernandes et al., 2005; Sobral et al., 2008; Oliveira et al., 2008; Takeda et al., 2008; Silva, 2009) e facilitar a recuperação da condição sensório-motora após lesão nervosa periférica. Dentre os recursos já investigados estão o exercício físico em esteira (Marqueste et al., 2004; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006; Sobral et al., 2008; Ilha et al., 2008), na água (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; Sarickcioglu e Oguz, 2001; Oliveira et al., 2008) e estimulado por ambiente enriquecido (Takeda et al., 2008).

Alguns autores recomendam que o estímulo à atividade neuromuscular por meio do exercício físico não seja iniciado logo após a lesão nervosa, devendo haver um período de repouso entre a lesão e o início do exercício, pois dependendo da extensão da lesão, o exercício durante a fase aguda pode reduzir a quantidade de unidades motoras e o brotamento axonal em músculos extensamente desnervados (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; 1982; Gordon et al., 2003).

Por outro lado, a indução de atividade física imediatamente após a lesão nervosa ou nos estágios iniciais da desnervação é recomendada por aumentar a

resistência à fadiga e restaurar as propriedades contráteis e a mecanossensibilidade do músculo (Marqueste, et al., 2004), sendo tais benefícios mantidos até a fase tardia da regeneração do nervo (Van Meeteren et al., 1997) com conseqüente recuperação funcional (Byun, et al., 2005; Seo, et al., 2006).

Van Meeteren et al. (1997) afirmam que, quando o exercício é iniciado na fase de desnervação, a recuperação sensório-motora e funcional é acelerada. Portanto, o exercício também pode ser eficaz na recuperação muscular, assim como, no crescimento e maturação axonal. Entretanto, alertam para a influência do exercício “intenso” na fase de desnervação, apontando seu efeito deletério, especialmente sobre a função muscular.

Sarickcioglu e Oguz (2001), submeteram coelhos à natação após esmagamento do nervo isquiático. Quatro semanas depois foram encontradas fibras nervosas mielinizadas no grupo natação, enquanto no grupo sedentário nenhuma fibra foi encontrada, apontando para o benefício desta modalidade de exercício na regeneração axonal.

Sobral et al. (2008), avaliaram o número de axônios após esmagamento nervoso e exercício em esteira, que foi iniciado 24 horas e 14 dias após a lesão. Depois de 30 dias, observaram que a recuperação funcional, o brotamento e a maturação axonal não foram prejudicados, mesmo quando o exercício foi iniciado precocemente, concluindo que o protocolo e a modalidade de exercício adotada não influenciaram a regeneração axonal, sugerindo que o exercício deve ser iniciado nesta fase para prevenir danos ao músculo.

Oliveira et al. (2008), analisaram o número de axônios de ratos submetidos à esmagamento do nervo isquiático e exercício na água 24 horas após. Trinta

dias depois encontraram maior número de axônios nos grupos desnervado e desnervado seguido de natação em relação ao controle, sugerindo que, mesmo não favorecendo a regeneração, a natação pode ser indicada neste tipo de lesão por contribuir com a recuperação muscular.

Modelos de neurotmesa seguidos de reparo cirúrgico do nervo podem testar a eficácia dos diferentes tipos de exercício físico (Ilha et al., 2008), por se tratar de um processo mais prolongado (Sunderland et al., 2004; Ilha et al., 2008), que poderia limitar mais efetivamente a função muscular devido à atrofia que se instala após a lesão (Yavuzer et al., 2002; Marqueste et al., 2004; Ilha et al., 2008) e que é dependente do tempo de desnervação/reinervação (Monte-Raso et al., 2006).

Os resultados deste estudo apontaram que, no grupo Controle, o número de axônios foi semelhante ao observado por outros estudos que utilizaram o nervo isquiático de animais da mesma espécie (Schmalbruch, 1986; Santo Neto et al., 1998; Souza, 2005; Sobral et al., 2008; Oliveira et al., 2008; Takeda et al., 2008).

Nos grupos experimentais o número de axônios da região do enxerto foi maior que na região distal e, a partir da 8ª semana, na região distal, esse número foi sempre maior que o encontrado no grupo Controle. Diversos autores relatam que após a secção nervosa, os axônios do segmento proximal originam de 2 a 3 brotos que crescem no interior dos tubos de membrana basal da célula de Schwann em direção ao músculo (Toft, Fugleholm e Schmalbruch, 1988; Ochi et al., 1994; Trumble e Parvin 1994; Danielsen, 1996; Lee, Scott e Wolfe, 2000), o que justifica esse achado, além de sugerir que o procedimento de reconexão

cirúrgica utilizando 2 pontos de sutura epineural em cada extremidade do nervo lesado foi efetivo, pois permitiu a observação de axônios regenerados no local em que o enxerto nervoso foi implantado.

Considerando o tempo necessário para o crescimento axonal após brotamento, o que ocorre numa velocidade média de 2-3 mm/dia após neurotome no rato (Fawcett e Keynes, 1990; Navarro, Vivo e Valero-Cabre, 2007), era esperado que, dependendo do período em que o nervo foi analisado após a lesão (4, 8 ou 12 semanas) o número de axônios no nervo distal fosse menor que na região do enxerto, o que ocorreu em todos os grupos submetidos à nátação neste estudo, havendo uma tendência de redução dessa diferença à medida que o tempo transcorrido da lesão fosse mais prolongado.

O número de axônios encontrados no nervo distal dos grupos E4 e N4 foi menor que no Controle, o que se justifica pelos achados de Fields e Ellisman (1986) e Le Beau et al. (1988), que observaram axônios amielínicos associados às células de Schwann apenas a partir da 3^a ou 4^a semana e axônios mielínicos, a partir da 5^a ou 6^a semana após do procedimento cirúrgico. Além disso, segundo Fawcett e Keynes (1990) e Navarro, Vivo e Valero-Cabre (2007), a taxa de regeneração axonal é inicialmente muito baixa, alcançando um valor constante a partir de 3-4 dias pós-lesão, sendo de aproximadamente 3-4mm/dia após lesão por esmagamento, e mais lenta (2-3mm/dia) após a secção e reparo nervoso.

Nos grupos, N8 e E12 observou-se menor número de axônios na região distal em relação ao enxerto, indicando que a formação de tecido cicatricial, comumente encontrada após este tipo de reparo, tenha formado uma barreira mecânica a passagem dos axônios em regeneração.

Quanto à influência do exercício de natação, observou-se que na região distal à lesão havia maior número de axônios no grupo N4 que no grupo E4. Tais diferenças também foram encontradas entre os grupos E8 e N8, sugerindo que o exercício de natação pode ter acelerado o brotamento axonal.

Ansselin, Fink e Davey (1997) analisaram a maturação das fibras nervosas e observaram redução do diâmetro dos axônios regenerados, que segundo os autores é um achado comum e está associado à privação de conexões terminais durante o processo de regeneração, colagenização aumentada, retração endoneural e efeitos tardios sobre o corpo celular.

A literatura aponta que no nervo isquiático normal, o diâmetro axonal varia entre 5 e 7 μm (Santo Neto et al., 2004; Souza, 2005), o diâmetro da fibra nervosa entre 9 e 12 μm (Lenihan et al., 1998b; Santo Neto et al., 2004; Souza, 2005) e a espessura da bainha de mielina, entre 1 e 2 μm (Santo Neto et al., 2004; Souza, 2005). Neste estudo valores semelhantes foram encontrados no grupo Controle.

Após 4 semanas de intervenção foi observado aumento no diâmetro axonal e da fibra nervosa da região distal do grupo Natação em relação ao grupo Enxerto, indicando que o exercício promoveu aceleração na maturação das fibras ainda na fase inicial da regeneração nervosa. Porém, após 12 semanas o grupo Natação alcançou valores de diâmetro do axônio e da fibra nervosa muito semelhantes aos observados no grupo Controle, portanto a natação foi capaz de acelerar a maturação axonal e de aumentar os diâmetros do axônio e da fibra nervosa até atingir valores de normalidade após 12 semanas de intervenção.

Verdú et al. (2000), afirmam que a maturação axonal raramente atinge valores controle, citando que o diâmetro da fibra recupera-se somente 75%, seis

meses após axoniotmese. Oliveira et al. (2008) apontam para 68,7% de recuperação do diâmetro da fibra nervosa, 30 dias depois de submeter ratos a axoniotmese e natação.

A diminuição da espessura da bainha de mielina se deve ao controle exercido pelo axônio sobre a bainha de mielina que o envolve, sendo a espessura da bainha de mielina proporcional ao diâmetro do axônio. Portanto, quando o diâmetro axonal é diminuído, após a degeneração e regeneração nervosa, a espessura da bainha de mielina que o envolve também é diminuída (Fraher e Dockery, 1998).

A razão G é um parâmetro relacionado à velocidade de condução do impulso nervoso. Segundo Torch, Usson e Saxod (1989), valores de razão G entre 0,6 e 0,79 indicam uma velocidade de condução nervosa normal. Ansselin, Fink e Davey, (1997) afirmam que os valores normais para razão G estão entre 0,6 e 0,7. Portanto quando esses valores são inferiores a 0,6 indicam densa mielinização. Por outro lado, quando ultrapassam 0,79, indicam fraca mielinização, havendo, em ambas as condições, alteração da velocidade de condução nervosa na fibra. Portanto, os resultados encontrados neste trabalho indicam que a natação não influenciou na velocidade de condução do impulso nervoso, mantendo-se dentro da faixa de normalidade apontada na literatura.

Resultado semelhante foi encontrado por Seo et al. (2006), que submeteram ratos a exercício em esteira. Para os autores, a atividade física induz alterações no sistema nervoso periférico, acelerando a regeneração axonal por estimular a síntese da proteína Cdc2 pelas células de Schwann, o que facilita o processo de regeneração axonal.

A aceleração no processo de brotamento axonal nas primeiras 8 semanas após a lesão pode estar relacionada à presença de um microambiente favorável à regeneração nervosa devido a liberação de fatores neurotróficos, que tem sido identificados como um dos principais responsáveis pela relação exercício-regeneração nervosa. Estes elementos orgânicos podem ser expressos de forma direta no tecido muscular durante o processo de regeneração nervosa, favorecendo assim a recuperação da morfologia do nervo e a funcionalidade da musculatura (Carrow et al., 1998; Mannion et al., 1999; Gómez-Pinilla et al., 2001; 2002; Ying et al., 2003; Rummler e Gupta, 2004).

Ao comparar o grupo E12 e N12, tanto na região do enxerto quanto na distal, o número de axônios encontrado foi semelhante em ambos os grupos, provavelmente porque a regeneração axonal ainda está em curso (Fawcett e Keynes, 1990; Burnett e Zager, 2004), com o crescimento dos brotos que emergiram no nervo íntegro proximal e estão seguindo em direção ao músculo, porém em ritmo mais lento (Fawcett e Keynes, 1990; Navarro, Vivo e Valero-Cabre, 2007). Ao se estabelecer essa conexão, tem início a eliminação sináptica (Gorio et al., 1983; Sanes e Lichtman, 1999; Love, Son e Thompson, 2003), que refletiria a diminuição do número de axônios. Entretanto, esse processo não chegou ao final em 12 semanas (Ijkema-Paassen et al., 2004), havendo ainda maior número de axônios na região distal em relação ao nervo controle. Possivelmente, uma análise em período mais prolongado poderia demonstrar uma redução do número de axônios devida à eliminação sináptica, bem como uma possível influência do exercício de natação nesse processo.

O aumento da liberação de fatores neurotróficos pode ter sido uma das causas do aumento do número de axônios no grupo natação em relação ao grupo enxerto nos períodos de 4 e 8 semanas.

Fatores neurotróficos, originalmente descritos por sua influência no crescimento e diferenciação neuronal, estão se tornando reconhecidos como reguladores da plasticidade sináptica (Yao et al., 1998; McAllister, Katz e Lo, 1999; Klintsova e Greenough, 1999). Os níveis destes fatores e/ou de seus receptores podem ser alterados pela atividade neuronal, sendo responsáveis por criar mecanismos para manter as mudanças na transmissão sináptica (Al-Majed, Brushard e Gordon, 2003; Canossa et al., 2001). Estudos comprovam que estas substâncias são efetivas no restabelecimento morfológico após lesão nervosa (Midha et al., 2003; Simon et al., 2003).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e as neurotrofinas 3 (NT-3) e 4 (NT-4) são importantes para a regulação da função sensório-motora (Carrow et al., 1998; Mannion et al., 1999; Thompson et al., 1999). Após exercícios físicos voluntários, a expressão de BDNF e NT-3 é aumentada na medula espinhal e no tecido muscular (Gómez-Pinilla et al., 2001; 2002; Ying et al., 2003). Desta forma, pode se considerar que a prática de exercício físico seja um fator de sinalização neurotrófica, uma vez que o aumento da atividade neuromuscular potencializa a produção de fatores tróficos.

6.2. REINERVAÇÃO MUSCULAR

A JNM permite a análise dos eventos que envolvem a interação entre os neurônios e seus órgãos alvo, devido a sua simplicidade e acessibilidade

estrutural, a separação morfológica de seus componentes e as informações existentes sobre a estrutura e a função de boa parte de seus componentes (Sanes, 1995, 1997; Walsh et al., 2000).

Após a interrupção da transmissão neuromuscular devido a desnervação, inicia-se o brotamento do terminal nervoso, como parte do processo de reinervação. Este brotamento mimetiza os eventos ocorridos durante o desenvolvimento da JNM. Portanto há uma reexpressão da NCAM e da N-cardenina na superfície das miofibrilas na tentativa de restabelecer o contato nervo-músculo (Rieger et al., 1998; Walsh et al., 2000; Lieber, 2002).

Com a chegada do terminal nervoso ao músculo inicia-se a reinervação muscular, com poliinervação dos receptores de RACHs. O nervo estimula o músculo a sintetizar acetilcolinesterase e a diminuir a síntese de receptores extrajuncionais, reduzindo a liberação de fatores neurotróficos pelas células de Schwann. Inicia-se então o processo de eliminação sináptica, desencadeado pela membrana pós-sináptica. Esta membrana fornece substâncias inibidoras ao crescimento de neuritos, os quais transformam-se em terminais nervosos, enquanto o cone de crescimento da origem ao botão sináptico, levando a monoinervação dos RACHs. Após o restabelecimento da contração muscular os fatores tróficos liberados pelos músculos também deixam de ser produzidos (Gorio et al., 1983; Love, Son e Thompson, 2003).

Desta forma, apesar de haver diferentes formas de análise da integridade da JNM após lesão nervosa, como a avaliação do padrão de distribuição dos RACHs (Marques et al., 2005), este estudo foi direcionado para a quantificação do número de receptores reinervados e avaliação da influência do exercício de

natação sobre esse processo, conforme realizado por Ijkema-Paassen et al. (2004).

Após 4 semanas de desnervação foram observadas JNMs poliinervadas somente no grupo Natação, indicando que o exercício de natação acelerou o brotamento e a maturação axonal, além da reinervação muscular ainda na fase inicial da regeneração, conforme também relatado por Van Meeteren et al. (1997) e Sarickcioglu e Oguz (2001).

Após 8 semanas nos grupos Enxerto e Natação foram encontradas 24% e 38% de JNMs monoinervadas, respectivamente. Decorridas 12 semanas, os grupos Enxerto e Natação apresentaram 56% e 87% de JNMs monoinervadas, respectivamente, sugerindo que a natação possa ter favorecido a eliminação sináptica e que, ao longo do tempo, este benefício é mantido em função da reorganização estrutural e funcional da JNM.

Quando comparado ao número de axônios nos respectivos tempos de análise, esse resultado confirma que a natação acelerou os processos de brotamento axonal a partir da 4ª semana e eliminação sináptica 8 semanas após o contato nervo-músculo, o que pode favorecer a recuperação funcional.

Dados divergentes foram encontrados por Ijkema-Paassen, Meek e Gramsbergen (2002), que realizaram autoenxerto do nervo isquiático em ratos e analisaram a reinervação do músculo sóleo, observando que 7 semanas após a lesão nenhuma JNM com aspecto normal foi observada, sendo que com 15 semanas, de 20 a 42% das JNMs estavam normais e após 21 semanas de 27 a 34% apresentaram-se normais.

O terminal nervoso pode afetar o número de RACH na membrana pós-sináptica pela liberação de substâncias tróficas e pela indução da atividade muscular. A atividade muscular bloqueia o aparecimento dos RACH por toda a fibra muscular, concentrando-os somente na região pós-sináptica, onde a influência local do nervo previne esse bloqueio (Andreose, Fumagalli e Lomo, 1995).

Neste estudo, nos grupos 4 e 8 semanas, observou-se maior número de RACH nos grupos Lesão, Enxerto e Natação em relação ao Controle. Isso pode ser explicado pela condição de desnervação, pois, segundo Lieber (2002), há aumento no número de receptores extrajuncionais no músculo desnervado, para torná-lo mais receptivo à reinervação.

Após 12 semanas foi observado maior número de RACHs no grupo Lesão em relação aos demais. Provavelmente, isso pode ter ocorrido pela a maior dispersão dos RACHs da superfície extrajuncional da fibra muscular na tentativa de atrair os axônios em crescimento (Lieber, 2002).

Neste estudo, observou-se presença de JNMs no grupo Natação 4 semanas, o que não foi observado nos grupos Lesão e Enxerto, indicando que o exercício de natação acelerou o processo de reinervação muscular. Porém, nos grupos 8 e 12 semanas o número de JNM no grupo Natação foi menor que o observado no grupo Enxerto.

Love, Son e Thompson (2003), observaram resultado diferente em estudo com os músculos sóleo e gastrocnêmio parcialmente desnervados e submetidos a eletroestimulação crônica. Notaram diminuição do brotamento axonal por redução na liberação de fatores tróficos aos axônios em regeneração e inibição da

formação de pontes entre os processos das células de Schwann perisinápticas das junções neuromusculares inervadas e desnervadas, dificultando a reinervação muscular, por conta do excessivo estímulo ao músculo. É provável que o estímulo fornecido pelo exercício de natação neste estudo não tenha se caracterizado como estímulo excessivo, como no caso da eletroestimulação crônica aplicada por esses autores.

6.3. RECUPERAÇÃO FUNCIONAL

O estudo experimental da regeneração nervosa subsequente a neurotome e reparo cirúrgico utilizando métodos histológicos, morfológicos e parâmetros eletrofisiológicos tem sido amplamente explorado. Porém, a recuperação funcional, avaliada pelo Índice Funcional do Ciático (IFC), fornece dados importantes sobre a função da pata pélvica do animal, além de ser o método que mais se aproxima da avaliação clínica (De Medinacelli et al., 1982; Bain et al., 1989; Munro et al., 1998; Dijkstra et al., 2000; Oliveira et al., 2008).

Observou-se que no período pré-operatório os animais de todos os grupos apresentaram valores de IFC dentro da normalidade, segundo os critérios apontados por Hare et al. (1992) e Dash et al. (1996).

Os animais do grupo L não foram submetidos ao reparo cirúrgico (L4, L8 e L12), apresentando redução da funcionalidade e progredindo gradativamente para piora da função ao longo do tempo. Yao et al. (1998), observaram completa incapacidade funcional em ratos após 12 semanas da secção do nervo isquiático sem reparo cirúrgico.

Após 4 semanas, tanto o grupo Enxerto quanto o Natação apresentaram valores de IFC entre -100 e -80, indicando perda completa da função. Tetik et al. (2002), observaram valores de IFC entre -120 e -140, após 4 semanas de secção do nervo isquiático de ratos, seguida de sutura epineural, indicando que nesta fase da regeneração nervosa a recuperação funcional ainda não foi iniciada.

No grupo 8 semanas os valores do IFC na 1ª e 5ª semana pós-operatória permaneceram entre -100 e -80, porém a partir da 6ª e 7ª semana o grupo natação apresentou melhora da função, atingindo valores entre -80 e -70, conforme também relatado por outros autores (Tetik et al., 2002). Desta forma, o início da recuperação funcional pode ter sido influenciado pelo exercício.

Após 12 semanas os grupos Enxerto e Natação seguiram com valores de IFC semelhantes até a 10ª semana, quando o grupo Natação apresentou IFC maior que o grupo Enxerto, onde foram observados valores de IFC próximos de -70 da 9ª a 11ª semana pós-operatória. Valores semelhantes também foram encontrados por outros autores (Yavuzer et al., 2002).

No grupo natação os valores de IFC alcançaram -54 e -46 na 10ª e 11ª semana pós-operatória, respectivamente. Portanto o exercício foi capaz de favorecer a recuperação funcional dos animais, provavelmente pela aceleração dos processos de reinervação e eliminação sináptica.

É possível que os estímulos táteis, térmicos e proprioceptivos fornecidos durante o exercício de natação tenha favorecido mecanismos de adaptação do sistema nervoso, pois sendo a desnervação unilateral, a ação bilateral das patas torácicas e pélvicas durante o exercício de natação pode ter estimulado o processo de ativação cruzada.

A ativação cruzada ocorre em músculos homólogos, portanto após o fortalecimento crônico utilizando contração voluntária máxima, a força de contração dos músculos treinados pode aumentar de 30 a 40%, enquanto os músculos homólogos não treinados contralaterais podem aumentar sua força em 20% (Hortobágyi, 2005). Porém, mesmo contrações submáximas unilaterais podem produzir ativação homóloga contralateral (Kristeva, Cheyne e Deecke, 1991).

Outros estudos apontam que o treinamento unilateral é capaz de aumentar em 7,8% a força do membro contralateral e em 35% a força ipsilateral, por meio de mecanismos ainda não definidos. Porém, sabe-se que a facilitação contralateral parece estar relacionada a mecanismos neurais centrais que envolvem excitação de regiões específicas do córtex cerebral durante a contração muscular voluntária (Munn, Herbert e Gandevia, 2004). Portanto, movimentos voluntários unilaterais podem promover a ativação do córtex motor contralateral (Kristeva, Cheyne e Deecke, 1991).

Mesmo não realizando a análise do córtex cerebral neste estudo, acredita-se que o aumento das conexões sinápticas e o aumento do *turnover* das espinhas neuronais (Grutzendler et al., 2002; Trachtenberg et al., 2002), cuja densidade e atividade podem variar devido a influências ambientais, bem como por meio do desmascaramento de sinapses silentes (Lundborg, 2003), tenham sido favorecidas pelo exercício, podendo aumentar a ativação do motoneurônio inferior e, conseqüentemente, favorecer a síntese de substâncias relacionadas à regeneração das fibras nervosas lesadas, por meio da neuroplasticidade.

Além disso, a ativação de músculos desnervados promove a elevação da densidade e fluxo dos capilares sanguíneos do músculo (Hudlicka et al., 1982), mantendo as condições metabólicas das fibras musculares, prevenindo sua atrofia e favorecendo a regeneração nervosa (Silva et al., 1999; Aas et al., 2002; Polacow et al., 2003).

Marqueste et al. (2004) demonstraram que existe uma provável relação entre a eletroestimulação muscular crônica e a recuperação funcional após uma lesão nervosa periférica. Eles postulam que tanto a estimulação elétrica neuromuscular quanto o exercício em esteira, apresentam-se como possíveis potencializadores da recuperação funcional aferente, após autoenxerto do nervo isquiático de ratos.

A analogia existente entre a prática do exercício físico e a potencialização da neuroplasticidade pode ser constatada também através de pesquisas, que relacionam a prática dos mais variados treinamentos físicos aos níveis orgânicos de fatores neurotróficos. Desde que o NT-3 foi identificado como sendo um fator crítico no desenvolvimento e reparo de circuitos neurais, sua regulação induzida pelo exercício pode ser uma importante estratégia para facilitar a recuperação funcional após lesão (Dubovy, 2004; Omura et al., 2005).

Ying et al. (2003) demonstram que ratos submetidos a corrida voluntária em esteira, pelo período de três a sete dias, desenvolvem um incremento na expressão de NT-3 e seu receptor na medula espinhal lombar e em músculos esqueléticos associados. Este fator neurotrófico possui efeito sobre as propriedades eletrofisiológicas das fibras nervosas do grupo Ia, o que leva à sua íntima relação com a recuperação da função sensorial nervosa (Mendell et al.,

1999). Todavia, é aparente que o exercício voluntário pode guiar a ação de vários fatores neurotróficos (Ying et al., 2003).

Num trabalho semelhante, Gómez-Pinilla et al. (2002) observaram um aumento nos níveis espinhais e musculares do BDNF quando ratos era submetidos a corrida voluntária, pelo período de 3 a 7 dias. Segundo os autores, este fato é importante para o estabelecimento do conceito de que o exercício físico promove, através de mudanças moleculares, transformações na plasticidade neural e função do sistema neuromuscular. Tal aspecto pode ser a fundamentação dos resultados encontrados neste estudo, uma vez que, ao potencializar a produção e expressão de fatores neurotróficos, o exercício físico promoveria melhora da capacidade de recuperação funcional.

Diante dos resultados encontrados, pesquisas com humanos utilizando o método adotado neste estudo serão necessárias para que a fisioterapia possa explorar esse recurso terapêutico na reabilitação de pacientes com acometimento de nervos, favorecendo sua recuperação funcional e retorno às atividades de vida diária e laboral.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que o protocolo de natação proposto favoreceu o brotamento e maturação das fibras nervosas na fase inicial da regeneração nervosa e acelerou o processo de eliminação sináptica após autoenxerto de nervo, além de acelerar a recuperação funcional dos animais, quando aplicado logo após a desnervação.

REFERÊNCIAS*

Aas V, Torbla S, Andersen MH, Jensen J, Rustan AC. Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell model of hyperglycemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 967: 506-15.

Alluin O, Wittmann C, Marqueste T, Chabas J, Garcia S, Lavaut M, et al. Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide. *Biomaterials.* 2009; 30: 363–373.

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.

Andreose JS, Fumagalli G, Lomo T. Number of junctional acetylcholine receptors: control by neural and muscular influences in the rat. *Journal of Physiology.* 1995; 483(2): 397-406.

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

Ashley WW, Weatherly T, Park TS. Collagen nerve guides for surgical repair of brachial plexus birth injury. *J Neurosurg* 2006; 106: 452-6.

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.

Bates e Hanson. *Exercícios Aquáticos Terapêuticos.* 1ª ed., São Paulo, Manole, 1998: 21-32.

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

Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results. *Microsurgery*. 2000; 20:32-36.

Becker BE, Cole AJ. *Comprehensive Aquatic Therapy*, Butterworth-Heinemann, Boston, 1997:16-28.

Bervar M. Video analysis of standing – an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Meth*. 2000; 102: 109-116.

Boninsegna A, D'Amelio G, Calzavara M, Bertolini M. Effect of swimming in thermal water on skeletal muscle, liver and heart glycogen. *Clin Physiol Biochem*. 1990; 8(6):318-21.

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.

Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(5): 1-7.

Brushart TM, Gerber J, Kessens P, Chen YG, Royall RM. Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. *J Neurosci*. 1998; 1; 18(21):8674-81.

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.

Campion MR. *Adult Hydrotherapy: A Practical Approach*. Heinemann Medical Books: Oxford, 1990.

Canossa M, Gartner A, Campana G, Inagaki N, Thoenen H. Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI) and Trk receptor activation is mediated via phospholipase C signaling pathways. *EMBO J*. 2001; 20: 1640-1650.

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

Caromano FA, Nowotny JP. Princípios físicos que fundamentam a hidroterapia. *Fisioterapia Brasil*. 2002; 3(6) nov/dez 1-9.

Carroll EW, Curtis RL, Sullivan DA, Melvin JL. Wallerian degeneration in the optic nerve of the wobbler-lethal (wl/wl) mouse. *Brain Res Bull*. 1992; 29: 411-418.

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.

Chatdokmaiprai C, Suwansingh W, Worapongpaiboon S. The turnover distal epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps. *J Med Assoc Thai*. 2006 May; 89(5):663-9.

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.

Danielsen N. Nerve regeneration and repair. *Diabetic Medicine*. 1996;13:677-78.

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.

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, Tenny KA, 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, Will KM, Booth FW, Gordon SE. Unlike myofibers, neuromuscular junctions remain stable during prolonged muscle unloading. *Journal of the Neurological Sciences.* 2003; 210: 5–10.

Deumens R, Jaken RJ, Marcus MA, Joosten EA. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods.* 2007 Aug 15; 164(1):120-30. Epub 2007 Apr 19.

Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Grambergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurol Sci.* 2000; 96: 89-96.

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.

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.

Endo C. Estudo dos efeitos do tratamento com laser num modelo experimental de lesão nervosa por esmagamento do nervo ciático em ratos [Dissertação]. Ribeirão Preto: USP; 2002.

Eisen AA, Carpenter S, Karpati G, Bellavance A. The effect of muscle hyper- and hypoactivity upon fibre diameters of intact and regenerating nerves. *J Neurol Sci.* 1973 Dec; 20(4):457-69.

Favero M, Lorenzetto E, Bidoia C, Buffelli M, Busetto G, Cangiano A. Synapse formation and elimination: role of activity studied in different models of adult muscle reinnervation. *J Neurosci Res*. 2007 Sep; 85(12):2610-9.

Fawcett JW, Keynes RJ. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. *J Neurosurg*. Springfield. 1986; 65(3): 354-363.

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.

Fields RD, Ellisman MH. Axons regenerated through silicone tube splices. II. Functional morphology. *Expl Neurol*. New York. 1996; 92: 61-74.

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.

Fried K, Arvidsson J, Robertson B, Pfaller K. Anterograde horseradish peroxidase tracing and immunohistochemistry of trigeminal ganglion tooth pulp neurons after dental nerve lesions in the rat. *Neuroscience*. 1991; 43(1):269-78

Gama SAM. Estudo experimental comparativo da ação das neurocinas cardiotrofina-1 e oncostatina-M na regeneração nervosa periférica [dissertação]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.

Glasby MA. Nerve growth in matrices of orientated muscle basement membrane: developing a new method of nerve repair. *Clinical Anatomy*, New York. 1990; 3: 161-182.

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.

Gomez-Pinilla F, Ying Z, Opazo P, Roy RR, Edgerton VR. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci.* 2001; 13: 1078-1084.

Gomez-Pinilla F, Ying Z, Opazo P, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol.* 2002; 88: 2189-2195.

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.

Grinnel A. Dynamics of nervemuscle interaction in developing and mature neuromuscular junction. *Physiol Rev.* 1995; 75: 789-834.

Grutzendler J, Kasthuri N, Gan WB. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature.* 2002; 420: 812-816.

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.

Hall ZW, Sanes JR. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell.* 1993; 72: 99-121.

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.

Hasegawa T, Nakamura S, Manabe T. et al. Vascularized nerve grafts for the treatment of large nerve gap after trauma to an upper extremity. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004; 124: 209-13.

Heath CA; Rutkowski G. The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. *Trends Biotechnol.* 1998;16:163-68.

Heijke GCM, Klopper PJ, Dutrieux RP. Vein grafts conduits versus conventional suturing in peripheral nerve reconstructions. *Microsurgery.* 1993;14:584-88.

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. Reinnervating rat skeletal muscle: 35% grade treadmill exercise. *Arch Phys Med Rehabil.* 1982; 63 (7): 313-8.

Hie, HB, Van Nie CJ, Vermculen-Van der Zee E. twitch tension, muscle weight and fiber area of exercised reinnervating rat skeletal muscle. *Arch Phys Med Rehabil.* 1982; 63(12): 608-12.

Hoffman PN, Lasek RJ. Axonal transport of the cytoskeleton in regenerating motor neurons: constancy and change. *Brain Res.* 1980; 202: 317–333.

Hortobágyi, T. Cross Education and the human central nervous system: mechanisms of unilateral interventions producing contralateral adaptations. *EEE Eng in Med and Biol Mag.* 2005: 22-28.

Hudlicka O, Dodd L, Renkin EM, Gray, SD. Early changes in fiber profile and capillary density in long-term stimulated muscles. *Am J Physiol.* 1982; 243(4): 528-35.

Hughes BW, Kusner LL, Kaminski HJ. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle & Nerve.* 2006; 33(4):445-461.

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

Ijikema-paassen J, Meek, MF, Gramsbergen A. Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve.* 2002; 25: 891-897.

Ijikema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials.* 2004; 25: 1583–1592.

Ilha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EES, Rigon P, Xavier LL, et al. Endurance and Resistance Exercise Training Programs Elicit Specific Effects on Sciatic Nerve Regeneration After Experimental Traumatic Lesion in Rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair.* 2008; 22(4): 355-367.

Jewett DLH, McCarroll R. Nerve regeneration and repair. Its clinical and experimental basis. St Louis: Mosby Company; 1980.

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

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

Keynes RJ, Hopkins WG, Huang CLH. Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle: guidance by residual muscle fibre basement membrane. *Brain Res.* 1984; 294(2): 275-281.

Kline DG. Surgical repair of peripheral nerve injury. *Muscle Nerve.* 1990 Sep; 13(9):843-52.

Klintsova AY, Greenough WT. Synaptic plasticity in cortical systems. *Curr Opin Neurobiol.* 1999; 9: 203-208.

Kristeva R, Cheyne D, Deecke L. Neuromagnetic fields accompanying unilateral and bilateral voluntary movements: topography and analysis of cortical sources. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1991; 81: 284-298.

Kotulska K, Larysz-Brysz M, Marcol W, Jóźwiak J, Grajkowska W, Lewin-Kowalik J. The influence of *trkB* deficiency on long-term outcome of peripheral nerve injury in mice. *Folia Neuropathol*. 2007; 45(2):82-92.

Le Beau JM, Elisman MH, Powell HC. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicon tubes. *J Neurocytol*. California. 1988; 17: 161-172.

Lee SK, Scott W, Wolfe MD. 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]*. 1998; 23(5):588-93.

LeVeau B, Lissner W. *Biomechanics of Human Motion*. 2^a ed., Saunder: Philadelphia, 1997.

Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function and plasticity: the physiological basis of rehabilitation*. 2 ed. San Diego: Lippincott Wilians e Wikins. 2002; 369.

Lolley RD, Bose WJ, Bastian F, Bassam B, Meyer FN, Anderson LD. Vein, silastic, and polyglycolic acid fine mesh: a comparative study in peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg*. 1995; 35(3):266-71.

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.

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

Lundborg G. *Nerve Injury And Repair*. First Edition. New York: Churchill Livingstone; 1988.

Lundborg G. Nerve injury and repair – a challenge to the plastic brain. *J Peripher Nerv Syst*. 2003; 8: 209-226.

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

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

Mackinnon SE; Dellon AL; O'Brien JP. Change in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle & Nerve*. 1991;14:116-1122.

Mannion RJ, Costigan M, Decosterd I, Amaya F, Ma QP, Holstege JC, et al. Neurotrophins peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 9385-9390.

Marques MJ, Conchello JA, Lichtman J W. From plaque to pretzel: Fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience*. 2000; 20: 3663-3675.

Marques MJ, Mendes ZTR, Minatel E, Santo Neto H. Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of long-term regenerated muscle fibers. *J Neurocytol*. 2005; 34: 387–396.

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.

Matsuura T, Ikata T, Takata S, Kashiwaguchi S, Niwa M, Sogabe T, et al. Effect of weight bearing on recovery from nerve injury in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2001; 91:2334-2341.

McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22: 295-318.

McQuarrie IG, Lasek RJ. Transport of cytoskeletal elements from parent axons into regenerating daughter axons. *J Neurosci.* 1989 Feb; 9(2):436-46.

Mendell LM, Johnson RD, Munson JB. Neurotrophin modulation of the monosynaptic reflex after peripheral nerve transaction. *J Neurosci.* 1999; 19: 3162-3170.

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.

Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Shoichet MS. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg.* 2003; 99: 555-565.

Millesi H. The current state of peripheral nerve surgery in the upper limb. *Ann Chir Main.* 1984; 3:18–34.

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

Munn J, Herbert RD, Gandevia SC. Contralateral effects of unilateral resistance training: a meta-analysis. *J Appl Physiol.* 2004; 96: 1861-1866.

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

Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress in Neurobiology*. 2007; 82: 163–201.

Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma*. 1998; 45: 116–122.

Ochi M, Wakasa M, Ikuta Y, Kwong WH. Nerve regeneration in predegenerated basal lamina graft: the effect of duration of predegeneration on axonal extension. *Exp Neurol*. 1994;128:216-25.

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 LS, Sobral LL, Takeda SYM, Betini J, Teodori RM. Estimulación eléctrica y natación en la fase aguda de la axonotmesis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperación funcional *Rev Neurol*. 2008; 47(1): 11-15.

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.

Pierucci A, Duek EAR, Oliveira ALR. Peripheral Nerve Regeneration through biodegradable Conduits Prepared Using Solvent Evaporation. *Tissue Engineering Part A*. May 2008, Vol. 14, No. 5: 595-606

Polacow M LO, Silva CA, Guirro RRJ, Campos MR, Borges JP. Estudo morfométrico do músculo sóleo desnervado 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.

Rieger F, Nicolet M, Pincon-Raymond M, Murawsky M, Levi G, Edelman GM. Distribution and role in regeneration of NCAM in the basal laminae of muscle and Schwann cells. *J. Cell Biol*. 1998; 107: 163–173.

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.

Ribchester RR. Mammalian neuromuscular junctions: modern tools to monitor synaptic form and function. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Jun; 9(3):297-305.

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

Robinson MD; Lawrence R. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle e Nerve*. 2000; 23(6): 863-73.

Ruff RL. Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. *Ann NY Acad Sci*. 2003; 998:1-10.

Rummler LS, Gupta R. Peripheral nerve repair: a review. *Curr Opin Orthop*. 2004; 15: 215-219, 2004.

Ruoti RG, Morris DM, Cole AJ. Aquatic Rehabilitation. New York, Lippincott, 1997:15 24.

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.

Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual Review of Neuroscience*. 1999; 22: 389-442.

Sanes JR. Genetic analysis of postsynaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1997; 7: 93–100.

Sanes JR. The synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Semin. Dev. Biol.* 1995; 6: 163–173.

Sanes JR. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(15): 12601-12604.

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.

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

Schmalbruch H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec*. 1986; 162: 71-81.

Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2003; 5:293-347.

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.

Silva AM. Regeneração nervosa e recuperação funcional após estimulação elétrica de alta voltagem. [dissertação Mestrado]. 64p. Piracicaba, Unimep; 2009.

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 desnervado. Rev. Bras Fisiot. 1999; 21(3): 55-60.

Simon M, Porter R, Brown R, Coulton GR, Terenghi G. Effect of NT-4 and BDNF delivery to damaged sciatic nerves on phenotypic recovery of fast and slow muscles fibres. Eur J Neurosci. 2003; 18: 2460-2466.

Skinnes AT, Thomson AM. Duffield: Exercícios na Água. 3ª ed., São Paulo, Manole 1985:4-22.

Sobral LL, Oliveira LS, Takeda SYM, Somazz, MC, Montebelo IL, Teodori RM. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise histomorfométrica e funcional. Rev Bras Fisiot. 2008; 12: 311-316.

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.

Spector DH, Boss BD, Strecker RE. A model three-dimensional culture system for mammalian dopaminergic precursor cells: application for functional intracerebral transplantation. Exp Neurol. 1993;124(2):253-64.

Suematsu N. Tubulation for peripheral nerve gap: its history and possibility. Microsurgery. 1989;10:71-74.

Sunderland, S. The anatomy and physiology of nerve injury. Muscle Nerve, v.13, p. 771-784, 1990.

Sunderland, I. et al. Effect of tension on nerve regeneration in rat sciatic nerve transection model. *Ann Plast Surg.* 2004; 53: 382–387.

Takeda SYM, Oliveira LS, Sobral LL, Somazz MC, Montebelo MIL, Teodori RM. Regeneración Nerviosa Periférica en ratones expuestos a un ambiente enriquecido. *Revista de Neurología.* 2008; 47: 185-190.

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.

Terzis JK, Skoulis TG, Soucacos PN. Vascularized nerve grafts. *International Angiology.* 1995;14:264-77.

Tetik C, Ozer K, Aylan S, Siemionow K, Browne E, Siemionow M. Convencional versus spineural sleeve neurorrhaphy technique: functional and histomorphometric analysis. *Ann Plast Surg.* 2002; 49: 397-403.

Thomas PK, Landon DN, King RHM. Disease of the peripheral nerves. In: Graham DI, Lantos PL. *Greenfield's neuropathology.* Licensing Agency, London. 1997; 367-487.

Thompson SW, Bennett DL, Kerr BJ, Bradbury EJ, McMahon SB. Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999, 96: 7714-7718.

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

Torch S, Usson Y, Saxod R. Automated morphometric study of human peripheral nerves by image analysis. *Pathol Res Pract.* 1989 Nov;185(5):567-71.

Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker, et al. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature.* 2002; 420: 788-794.

Trumble TE, Parvin D. Physiology of peripheral nerve graft incorporation. *J Hand Surg Am.* 1994 May;19(3):420-7.

Vallat JM, Magy L. Neuropathies peripheriques: generalites. *EMC Neurologie.* 2005; 2: 175-181.

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.* 1997; 78 (1): 70-77.

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, 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, 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.

Waldram M. Peripheral nerve injuries. *Trauma.* 2003; (5): 79-96.

Walsh FS, Hobbs C, Wells DJ, Slater CR, Fazeli S. Ectopic expression of NCAM in skeletal muscle of transgenic results in terminal sprouting at the neuromuscular junction and altered structure but not function. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2000; 15 (3): 244-261.

Walsh S, Biernaskie J, Kemp SW, Midha R. Supplementation of acellular nerve grafts with skin derived precursor cells promotes peripheral nerve regeneration. *Neuroscience*. 2009; 164(3):1097-107.

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

Willis L, Quintero EM, Nelson M, Granholm ACh. Regulation of trophic factor expression by innervating target regions in intraocular double transplants. *Cell Transplant*. 2005;14(1):21-9.

Willmann R, Fuhrer C. Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptor revisited. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002; 59: 1296-1316.

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.

Yao M, Inserra MM, Duh MJ, Terris DJ. A Longitudinal, Functional Study of Peripheral Nerve Recovery in the Mouse. *Laryngoscope*. 1998; 108: 1141-1145.

Yavuzer R, Aylan S, Latifoglu O, Atabay K. Turnover epineural sheath tube in primary repair of peripheral nerves. *Ann Plast Surg*. 2002; 48; 392-400.

Ying Z, Roy RR, Edgerton VR, Gomez-Pirilla F. Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. *Brain Res*. 2003; 987: 93-99.

You SW, So K.F, Yip HK. Axonal regeneration of retinal ganglion cells depending on the distance of axotomy in adult hamsters. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41:3165-70.

Yu H, Peng J, Guo Q, Zhang L, Li Z, Zhao B, et al. Improvement of peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts with local release of nerve growth factor. *Microsurgery*. 2009; 29(4):330-6.

Yuksel F, Ulkur E, Baloglu H, Celikös B. Nerve regeneration through a healthy peripheral nerve trunk as a nerve conduit: a preliminary study of a new concept in peripheral nerve surgery. *Microsurgery*. 2002; 22:138-43.

ANEXO



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

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 039/2008

Protocolo nº 039/2008

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 24ª. Reunião, ocorrida em 16/09/2008, **APROVOU** o trabalho intitulado REGENERAÇÃO NERVOSA E REINERVAÇÃO MUSCULAR APÓS AUTOENXERTO DE NERVO E EXERCÍCIO DE NATAÇÃO EM RATOS, elaborado por Rosana Macher Teodori, Elaine Minatel e Joice Betini.

São Carlos, 16 de setembro de 2008.


Prof.ª. Dr.ª. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal