



UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Exercício imediato *versus* tardio na regeneração do nervo isquiático  
de ratos após axoniotmese: análise morfométrica e funcional**

**Luciane Lobato Sobral**

**2007**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

LUCIANE LOBATO SOBRAL

EXERCÍCIO IMEDIATO *VERSUS* TARDIO NA  
REGENERAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO DE  
RATOS APÓS AXONOTOMIA: ANÁLISE  
MORFOMÉTRICA E FUNCIONAL

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.

Orientadora: Profª Drª Rosana Macher Teodori

PIRACICABA  
2007

Sobral, Luciane Lobato

Exercício imediato *versus* tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise morfométrica e funcional. Piracicaba, 2007  
93 p.

Orientador: Profª Drª Rosana Macher Teodori

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

1. Regeneração nervosa. 2. Exercício físico. 3. Morfometria. 4. Índice Funcional do Ciático. 5. Plasticidade neuromuscular. I. Teodori, Rosana Macher. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. III. Título.

Dedico este trabalho a minha avó Odir Ana de Carvalho Lobato e aos meus pais Acácio e Ana Lidia Sobral, por toda uma vida de amor e dedicação que muitas vezes abdicaram de algo para contribuir com a minha formação.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

- Aos meus irmãos Viviane e André por serem os meus melhores amigos e confidentes, nos quais tenho a certeza que poderei confiar em todos os momentos da minha vida.
- Ao meu noivo Marcio, por sempre me apoiar em todos os momentos e me ajudar a superar todas as dificuldades encontradas nesses 6 anos de convivência.
- À minha segunda mãe Josefa Duvalina, por sempre pedir o meu bem estar.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

- À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Macher Teodori, que me mostrou o conhecimento científico e contribuiu para minha formação profissional. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação, incentivo e compreensão.
- À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosangela Verlêngia, por abrir as portas do LIP para a realização do treinamento dos animais na esteira ergométrica.
- Às amigas Larissa, Sibeles e Joice, por terem participado ativamente deste trabalho, dedicando tempo e paciência.
- Ao apoio financeiro das instituições FAPESP e FAP- UNIMEP

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus, por me dar saúde e a oportunidade de chegar até aqui.
- À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Viviane Balisardo Minamoto, pela amizade e pela grande contribuição na minha formação.
- Às minhas companheiras e amigas de casa Larissa Salgado e Clívia Bandeira, por esses 3 anos de convivência, amizade e apoio.
- Às grandes amigas Roberta Zuttin e Ana Cristina, pela amizade e disponibilidade em ajudar e escutar em alguns momentos dessa caminhada.
- Às técnicas do Laboratório de Fisiologia Mel e Patrícia, pelo auxílio, contribuindo com o desenvolvimento desta pesquisa.
- A todos os professores e funcionários da UNIMEP, que contribuem para o crescimento deste curso, possibilitando que a Fisioterapia seja uma profissão admirada por todos.
- A todos os amigos do Laboratório de Pesquisa em Plasticidade Neuromuscular da UNIMEP: Rodrigo, Silvana, Fabio, Giovana,

Quém, por compartilhar os bons momentos vividos naquele ambiente e contribuir para a elaboração desta pesquisa.

- A todos os amigos do Mestrado em Fisioterapia da UNIMEP, Rommel, João Paulo, Luciano, Viviane, Mariana, Silvia, Ana Flávia, Giovana, Priscila, Vandénir, Érica e Karina. Espero não ter esquecido ninguém. Caso sim, sintam-se agradecidos por, de alguma forma, terem compartilhado comigo os momentos dessa caminhada.



“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

Fernando Pessoa

## RESUMO

Devido à controvérsia sobre o melhor momento para iniciar o exercício físico, bem como sobre sua influência na regeneração nervosa, este estudo se propôs a analisar morfológica e funcionalmente a influência do exercício físico em esteira, aplicado na fase imediata e tardia do processo de regeneração do nervo isquiático de ratos, após axoniotmese. Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, pesando 229,05g ( $\pm 18,02$ ) divididos em 4 grupos: Controle (CON); Desnervado (D); Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG) e Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE). Após 24 horas da lesão, o grupo DEG iniciou exercício na esteira, enquanto o grupo DGE iniciou no 14º dia. O protocolo de exercício foi: velocidade 8 m/minuto, sem inclinação, por 30 minutos durante 14 dias. Após 33 dias, o nervo foi exposto e fixado *in situ* e a porção distal à lesão foi incluída em resina e analisada em microscopia óptica. Cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e submetidos a análise morfométrica. Para análise funcional, foi realizado o registro da marcha (pré-operatório, 7º, 14º, 21º e 28º dias pós-operatório), através do Índice Funcional do Ciático (IFC). Aplicou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para análise morfométrica, utilizou-se o teste Anova - F (One-Way) seguido de Tukey; para análise funcional da marcha, utilizou-se o teste Anova - F (Two-Way) na comparação intragrupos e o teste Anova F (One-Way) seguido de Tukey na comparação intergrupos. Para comparação dos resultados morfométricos e funcionais, utilizou-se o teste de correlação de Pearson. Os resultados da análise morfométrica mostraram que apenas o diâmetro do axônio do grupo DGE foi maior que o do grupo D, enquanto que o diâmetro da fibra nervosa e a espessura da bainha de mielina em cada grupo apenas apresentaram diferença significativa com o grupo CON. A razão G não diferiu entre os grupos experimentais. Os grupos D, DEG e o DGE apresentaram número de axônios maior que o grupo CON ( $p < 0,05$ ). Para análise funcional da marcha, a comparação intergrupos não mostrou diferença estatisticamente significativa, enquanto na comparação intragrupos, o 7º e o 14º dia diferem significativamente do período pré-operatório, enquanto o 21º e o 28º dia diferem significativamente do 7º e do 14º dia, durante os períodos de avaliação funcional. O teste de correlação demonstrou fraca correlação entre os dados morfométricos e funcionais. Conclui-se que o protocolo de exercício em esteira, tanto na fase imediata como tardia da regeneração nervosa após esmagamento do nervo isquiático de ratos, não influenciou o brotamento axonal, o grau de maturação das fibras regeneradas, nem a funcionalidade dos músculos reinervados.

**Palavra Chaves:** regeneração nervosa, exercício físico, morfometria, Índice Funcional do Ciático (IFC), plasticidade neuromuscular.

## ABSTRACT

Due to there are controversies regarding the best moment to begin the physical exercise, as well as its influence on nerve regeneration, the aim of this study was to analyze morphologic and functionally the influence of the physical exercise on treadmill applied on immediate and final phases of the rat sciatic nerve regeneration process on rats after crush injury. It was used 20 males Wistar rats, weighing 229.05 g ( $\pm$  18.02) divided in 4 groups: Control (CON); Denervated (D); Denervated + Exercise + Cage (DEC) and Denervated + Cage + Exercise (DCE). After 24 hours of injury, the DEC group started the exercise on the treadmill while the DCE group started on the 14th day. The exercise protocol was: speed 8 m/min, without inclination, for 30 min during 14 days. After 31 days, the sciatic nerve was exposed and fixed *in situ* and the distal segment was include in resin and analyses by optical microscopy. Semi-thin sections were stained in toluidine blue and submitted to morphometric analysis. To the functional analyze it was performed the hind footprints (pre operatory, 7th, 14th, 21st, 28th days pos operatory) through the Sciatic Functional Index (SFI). It was applied a normality Shapiro-Wilk test. To the morphometric analysis it was used the ANOVA-F (*one-way*) test followed by Tukey test; to walking track analysis, it was used the ANOVA-F (*two-way*) test on the intra groups comparisons, the ANOVA-F (*one-way*) test followed by Tukey test was applied on inter groups comparison. For comparison of morphometric and functional results, it was used the PEARSON test correlation. The results of morphometric analysis showed that only the axon diameter of the DCE group was higher than the D group, whereas the nerve fiber diameter and myelin sheath thickness in each group only showed significant differences with the CON group. The G-ratio did not show among the experimental groups. The D, DEC and DCE groups, showed axonal number higher than the CON group ( $p < 0.05$ ). For walking track analysis, an inter group comparison did not show statistically significant difference, whereas the intra groups comparison, the 7th and 14th day differ significantly of the pre operatory period, while the 21th and 28th day differ significantly of the 7th and 14th day, during the periods of functional evaluation. The correlation test showed weak correlation among the morphometric and functional data. It is concluded that the treadmill exercise protocol, even on immediate or delayed phase of nerve regeneration after rat sciatic nerve crush injury, did not influence the axonal sprouting, the level of maturity of regenerated fibers or the re-innervated muscles functionality.

**Key word:** nerve regeneration, physical exercise, morphometry, Sciatic Functional Index (SFI), neuromuscular plasticity.

## SUMÁRIO

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO.....   | 15 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA.....  | 18 |
|   | 2.1 Estrutura do Nervo Periférico.....                            | 18 |
|   | 2.2 Lesão Nervosa Periférica.....                                 | 20 |
|   | 2.3 Processo de Degeneração e Regeneração Nervosa Periférica..... | 22 |
|   | 2.4 Respostas do Músculo à Desnervação.....                       | 25 |
|   | 2.5 Avaliação Funcional da Marcha.....                            | 27 |
|   | 2.6 Exercício Físico e Regeneração Nervosa Periférica.....        | 29 |
| 3 | OBJETIVO.....   | 36 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS.....   | 37 |
|   | 4.1 Aspectos Éticos.....  | 37 |
|   | 4.2 Local e Condições Ambientais do Estudo.....                   | 37 |
|   | 4.3 Grupos Experimentais.....                                     | 37 |
|   | 4.4 Seleção dos Animais para o Exercício em Esteira .....         | 38 |
|   | 4.5 Adaptação dos Animais.....                                    | 39 |
|   | 4.6 Lesão Nervosa.....  | 39 |
|   | 4.7 Realização do Exercício Físico.....                           | 42 |
|   | 4.8 Processamento do Nervo.....                                   | 43 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.9      | Análise Morfométrica.....   | 44        |
| 4.10     | Análise Quantitativa.....   | 46        |
| 4.10.1   | Número de Axônios.....  | 46        |
| 4.11     | Análise Funcional da Marcha.....  | 46        |
| 4.12     | Análise Estatística.....  | 49        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>50</b> |
| 5.1      | Esmagamento do Nervo Isquiático.....  | 50        |
| 5.2      | Análise Histológica.....  | 51        |
| 5.3      | Análise Quantitativa.....   | 53        |
| 5.3.1    | Número de Axônios.....  | 53        |
| 5.4      | Análise Morfométrica.....   | 54        |
| 5.4.1    | Diâmetro de Axônios.....  | 54        |
| 5.4.2    | Diâmetro das Fibras.....  | 55        |
| 5.4.3    | Espessura das Bainhas de Mielina.....   | 56        |
| 5.4.4    | Razão G.....  | 57        |
| 5.5      | Análise Funcional da Marcha.....  | 57        |
| 5.6      | Correlação entre os dados Morfométricos e o Índice Funcional<br>do Ciático..... | 62        |

|   |    |
|---|----|
| 6 DISCUSSÃO.....  | 65 |
| 6.1 Considerações Gerais sobre o Material e Métodos.....        | 65 |
| 6.1.1 Animais Experimentais.....                                | 65 |
| 6.1.2 Modelo de Lesão Nervosa.....                              | 66 |
| 6.1.3 Protocolo de Exercício.....                               | 67 |
| 6.1.4 Regeneração Axonal e Análise Morfométrica .....           | 70 |
| 6.1.5 Correlação entre os Resultados Morfométricos e Funcionais | 75 |
| 6.1.6 Análise Funcional da Marcha.....                          | 77 |
| 7 CONCLUSÃO.....  | 81 |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                    | 82 |
| REFERÊNCIAS.....  | 83 |
| ANEXO 1.....  | 93 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF – Brain-Derived Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)

E - Experimental

IFC – Índice Funcional do Ciático

IGF-I – Insulin-Like Growth Factor-I (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina)

ITS – Intermediate Toes Spread (Largura intermediária da pegada)

LA – Limiar de anaerobiose

Lan - Limiar anaeróbio

µm – Micrômetro

N – Normal

NCAM – Neural Cell Adhesion Molecule (Molécula de Adesão Celular Neural)

NGF – Nerve Growth Factor (Fator de Crescimento Nervoso)

NT-3 – Neurotrofina-3

NT-4 – Neurotrofina-4

PL – Print Length (Comprimento da pegada)

TS – Toe Spread (Largura da pegada)

## 1 INTRODUÇÃO

Considerando a plasticidade do sistema nervoso, ou seja, a capacidade de adaptar sua estrutura e função em resposta às exigências intrínsecas e extrínsecas (Lundy-Ekman, 2000), sendo a regeneração nervosa periférica um exemplo desta plasticidade (Machado, 1993; Lundy-Ekman, 2000; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005), diversos estudos experimentais têm sido direcionados a avaliar a lesão, a regeneração e a possível recuperação funcional após esmagamento, estiramento ou secção completa de nervos (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; 1980a; Mira, 1979; Hie, Van Nie e Vermculen-Van der Zee, 1982; Van Meeteren, 1997, Marqueste et al., 2004; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006).

A desnervação produz profundas alterações motoras, sensitivas e vasomotoras, que se caracterizam por diminuição da área de secção transversa das fibras e aumento do tecido conjuntivo do músculo (Fernandes et al., 2005), diminuição ou ausência da sensibilidade, e conseqüente incapacidade para realizar função (Pachioni et al., 2006).

A Fisioterapia desempenha papel fundamental na prevenção e tratamento dessas disfunções (Fernandes et al., 2005). Entretanto, a recuperação funcional é um processo lento que depende da natureza e do grau da lesão, bem como da regeneração e da maturação do nervo (Verdú et al., 2000; Robinson, 2000).

Os métodos mais utilizados para mensurar a regeneração nervosa são a histologia, a morfometria, a eletrofisiologia e os estudos funcionais. Entretanto, uma correlação dos resultados de tais análises é necessária (Dijkstra et al., 2000),



pois não há indicação de que o resultado de uma análise seja semelhante ao de outra (Munro et al., 1998).

Para o tratamento da lesão nervosa, diferentes recursos podem ser utilizados, como eletroestimulação fásica de baixa frequência (Fernandes et al., 2005), eletroestimulação crônica de baixa frequência (Dennis et al., 2003), o laser (Endo, 2002), o ultra-som (Monte-Raso et al., 2006) e o exercício físico (Herbison, Jaweed e Ditunno 1974; 1980a; 1980b; 1982; Hie, Van Nie e Vermculen-Van der Zee, 1982; Van Meeteren et al., 1997; Marqueste et al., 2004; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006), entre outras.

A cinesioterapia tem lugar de destaque como método fisioterapêutico para reabilitação após lesão nervosa periférica, sendo capaz de determinar no homem e em outros animais, um conjunto de adaptações funcionais e estruturais (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1980a, 1982; Seo et al., 2006).

Porém, a literatura aponta controvérsia sobre o melhor período para realizar a atividade física, sendo que a maioria dos trabalhos discute os efeitos do exercício físico na fase de reinervação do músculo (aproximadamente duas semanas após a lesão nervosa), afirmando que deve haver um período de repouso antes do exercício (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; 1980a; Hie, Van Nie e Vermculen-Van der Zee, 1982), devido ao número ainda insuficiente de unidades contráteis, sendo a reinervação evidente somente entre o 14<sup>o</sup> e o 21<sup>o</sup> dia pós-lesão (Herbison et al., 1973a).

Por outro lado, o exercício realizado na fase de desnervação (12 horas ou um a três dias após a lesão nervosa), acelera o retorno da função sensório-motora na fase inicial da recuperação da lesão (Van Meeteren et al., 1997) e melhora a recuperação funcional, verificada por meio do Índice Funcional do

Ciático (IFC) (Van Meeteren et al., 1997; Byun et al., 2005, Seo et al., 2006) e da diminuição do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Byun et al., 2005).

Considerando a controvérsia sobre o melhor momento para iniciar o exercício após a lesão nervosa, este estudo se propôs a investigar a influência do exercício iniciado na fase de desnervação (imediate) e de reinervação (tardia), sobre as características morfológicas e funcionais do nervo isquiático regenerado após axoniotmese, bem como a correlação entre os dados morfométricos e funcionais, com o propósito de fornecer subsídios para futuras investigações clínicas e discussão sobre novas condutas durante a reabilitação.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2. 1 Estrutura do Nervo Periférico

Os nervos são responsáveis por conduzir informações da periferia para o sistema nervoso central e deste para os órgãos efetores, sendo que qualquer lesão no seu trajeto ocasiona déficits sensoriais e motores permanentes ou transitórios. Desta forma, a compreensão de sua anatomia é fundamental (Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

O nervo é constituído por feixes de fibras nervosas envolvidas por bainhas conjuntivas. As fibras podem ser mielínicas ou amielínicas. Nas fibras mielínicas, em que o calibre varia entre 7,5 a 20  $\mu\text{m}$  (Fugleholm, Schmalbruch e Krarup, 2000), as células de Schwann formam uma bainha envolvendo cada axônio, que não é continua, sendo interrompida a cada 1 a 2 mm por nodos de Ranvier. As células de Schwann se originam do ectoderma e, durante o crescimento, envolvem várias vezes o axônio para formar a bainha de mielina, sendo que cada uma apresenta-se revestida por membrana basal (Todd e Bowman, 1975; Kefalides et al., 1979 apud Teodori, 1996).

Nas fibras amielínicas, cujo calibre varia de 0,5 a 2  $\mu\text{m}$ , uma célula de Schwann pode envolver vários axônios, não sendo separadas entre si por nodos de Ranvier (Machado, 1993; Guyton e Hall, 2002).

O suprimento vascular do nervo é bem desenvolvido, estando os vasos dispostos nas várias camadas que compõem a bainha conjuntiva, regulando o fluxo sanguíneo local (Pachioni et al., 2006).

As bainhas conjuntivas, representadas pelo endoneuro, perineuro e epineuro, fornecem resistência, elasticidade e proteção aos nervos. Além disso,

cada camada apresenta uma estrutura individual e peculiaridades funcionais que são extremamente importantes para a nutrição, integridade das fibras e transmissão do impulso nervoso (Sunderland, 1965).

O endoneuro é uma delicada camada de tecido conjuntivo sobre cada fibra nervosa, composta de fibroblastos, capilares e fibras colágenas, sendo a maioria dessas fibras disposta longitudinalmente. Apesar de apresentar elasticidade e resistência, a fibra nervosa é muito suscetível à compressão e ao estiramento. Assim, esta camada necessita da proteção do perineuro e do epineuro (Sunderland, 1965; Welch, 1996).

O perineuro é uma fina, mas densa e distinta bainha de células achatadas e dispostas concêntrica, que envolve determinado número de fibras nervosas que constituem um fascículo. Sua função é proteger as fibras que envolvem e funcionar como uma barreira bidirecional de difusão, preservando o microambiente (Sunderland, 1965; Oldfors e Johansson, 1979).

O epineuro é uma densa bainha de tecido conjuntivo que envolve todo o nervo. Essa camada contém fibras colágenas e elásticas, mastócitos, macrófagos e fibroblastos. O tecido adiposo raramente é observado, mas pode se constituir em elemento importante para proteção do nervo contra forças deformadoras (Sunderland, 1965).

## 2. 2 Lesão Nervosa Periférica

Devido à grande distribuição e à localização dos nervos, lesões nervosas são freqüentes e geralmente resultam de traumas (Robinson, 2000).

Atualmente, lesões decorrentes de acidentes automobilísticos são mais freqüentes que aquelas causadas por trauma penetrante, resultando em consideráveis incapacidades motoras e diminuição ou ausência de sensibilidade no território do nervo acometido (Robinson, 2000; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005). No membro superior, os nervos mais suscetíveis à lesão são: o radial, seguido pelo ulnar e mediano, devido à proximidade do nervo radial com o úmero; enquanto no membro inferior, os mais suscetíveis são o nervo isquiático, seguido pelo nervo fibular e, mais raramente, pelo nervo femoral e tibial devido à proximidade do nervo isquiático com a articulação do quadril (Robinson, 2000; Ferreira, 2006).

Seddon (1943) apud Burnet e Zager (2004), estabeleceu uma classificação da lesão nervosa periférica, considerando três tipos de lesão: neuropraxia, axoniotmese e neurotmeze, estabelecidas de acordo com a preservação ou perda do tecido conjuntivo do nervo após a lesão.

A neuropraxia é a forma mais branda de lesão, onde há um bloqueio de condução, não havendo perda de continuidade axonal, nem degeneração dos constituintes axonais, sendo a recuperação rápida e completa em poucas semanas (Welch, 1996; Robinson, 2000; Burnett e Zager, 2004; Omura et al., 2005).

A axoniotmese é uma lesão mais grave, apresentando danos suficientes para promover a degeneração Walleriana. O prognóstico da

recuperação funcional depende da regeneração nervosa, que ocorre espontaneamente, uma vez que os envoltórios conjuntivos e a microcirculação foram preservados. (Lundborg, 1987; Robinson, 2000; Burnett e Zager, 2004; Omura et al., 2005).

A neurotmeose é o tipo de lesão mais grave, havendo completa ruptura do nervo. A regeneração nervosa depende da reconexão cirúrgica dos cotos. Porém, mesmo com um reparo adequado, o prognóstico de recuperação funcional é limitado devido à possibilidade de formação de neuroma entre os cotos, o qual se constitui numa importante barreira à recuperação funcional (Stoll e Muller, 1999; Omura et al., 2005).

Outra classificação, estabelecida por Sunderland (1978) e citada por Burnett e Zager (2004), caracteriza a lesão nervosa periférica em cinco graus. Os graus I e II correspondem respectivamente à neuropraxia e axoniotmeose, definidas anteriormente por Seddon (1943). Os graus III, IV e V são denominados de acordo com o acometimento dos envoltórios conjuntivos. Assim, o grau III determina uma perda da continuidade axonal com lesão do endoneuro; o grau IV considera uma lesão no axônio juntamente com o endoneuro e perineuro; e o grau V se caracteriza pelo acometimento de todas as estruturas do nervo.

A compreensão adequada do tipo de lesão nervosa é extremamente importante para clínica terapêutica, pois permite o estabelecimento de prognósticos funcionais, bem como de um plano de tratamento adequado (Burnett e Zager, 2004).

### **2.3 Processo de Degeneração e Regeneração Nervosa Periférica**

Diversas modificações bioquímicas, celulares e moleculares estão presentes após a secção ou esmagamento nervoso, com a finalidade de recuperar a função do nervo danificado (Burnett e Zager, 2004).

Após axoniotmese ou neurotmese ocorre a desintegração do axônio e da bainha de mielina, seguida de profundas alterações da célula nervosa no local da lesão, bem como nas regiões proximal e distal a esta.

Quando um nervo é seccionado ou esmagado, evidenciam-se um segmento proximal, em continuidade com o centro trófico, e um segmento distal, separado do corpo celular (Bishop, 1982; Stoll e Muller, 1999; Burnet e Zager, 2004; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

As modificações morfológicas e estruturais que ocorrem na porção proximal após a lesão nervosa são denominadas de efeito retrógrado (Lieberman, 1971). Dentre essas, a cromatólise é um evento caracterizado pela dissociação do corpúsculo de Nissl, desintegração de grandes porções de retículo endoplasmático rugoso e a dispersão dos ribossomos no citoplasma da célula. Além disso, observa-se aumento de volume do corpo celular, migração do núcleo para a periferia e alterações metabólicas, como a diminuição de componentes do citoesqueleto (Welch, 1996; Stoll e Muller, 1999; Burnett e Zager, 2004; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

Quando o segmento nervoso distal perde a comunicação com o centro trófico da célula, não consegue manter sua estrutura e integridade. Inicia-se então a degeneração Walleriana, que se evidencia pela remoção dos restos finais da degradação e fagocitose da substância axonal, o que deixa o tubo endoneural

vazio, numa preparação para o crescimento de novos axônios (Bishop, 1982; Lundborg, 1987; Burnett e Zager, 2004; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005). Durante esse processo, a bainha de mielina ao redor do axônio é fagocitada, inicialmente pelas células de Schwann (aproximadamente 24 horas após a lesão) e, secundariamente, pelos macrófagos (Burnett e Zager, 2004). Após remoção do material degenerado os macrófagos retornam aos capilares e as células de Schwann, através de um processo de interdigitação de seus citoplasmas, formam cordões lineares denominados de “bandas de Bungner” ou “coluna de células de Schwann” (Stoll e Muller, 1999; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005) e irão atuar no sentido de favorecer a regeneração nervosa.

Durante a degeneração Walleriana, a lâmina basal das células de Schwann permanece íntegra, o qual consiste de uma matriz de colágeno tipo IV associada à glicoproteínas como a laminina, desenvolvendo importante papel na formação, manutenção e degeneração da bainha de mielina (Fried e Bruck, 1993; Perry, Brown e Andersson, 1993; Welch, 1996; Stoll e Muller 1999; Maki, 2002).

No que se refere ao papel das células de Schwann nesse processo, Fawcett e Keynes (1990) atribuem a elas uma das atuações mais relevantes na regeneração, servindo como fatores promotores de neuritos na produção do fator de crescimento nervoso (NGF) e do BDNF e auxiliando os macrófagos a fagocitarem os restos de axônio e mielina, provenientes da degeneração.

A regeneração inicia-se poucas horas após o trauma, quando a extremidade axonal ligada ao corpo celular origina um grande número de finos prolongamentos (brotos axonais), que avançam distalmente (Brushart, 1993). No caso de neurotmeose, esses brotos axonais podem ser mal direcionados devido à presença de tecido cicatricial, resultando em conexões nervosas anormais,



restrições da maturação das fibras nervosas e alterações na arquitetura muscular (Gutmann e Jakoubek, 1963; Carter et al., 1998).

O sucesso da regeneração depende de vários fatores, como a interação do cone de crescimento e dos neuritos com as substâncias do meio extracelular até que o alvo seja atingido (Stoll e Muller, 1999), das alterações no corpo celular (cromatólise) e da atuação das células de Schwann, macrófagos e fibroblastos (Fawcett e Keynes, 1990).

Fatores também importantes para a regeneração nervosa periférica são: a molécula de adesão celular neural (NCAM), a N-caderina e o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), que atuam favorecendo o crescimento do axônio, promovendo a proliferação de células de Schwann e inibindo apoptose (Ide, 1996; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005). Omura et al. (2005) citam que as proteínas como o BDNF, neurotrofina-3 (NT3) e neurotrofina-4 (NT4), expressadas de acordo com o tipo de lesão nervosa, favorecem a sobrevivência, diferenciação e regeneração no sistema nervoso central e periférico.

A etapa que sucede a regeneração é a de maturação dos axônios, visando “recuperação” das dimensões das fibras e da velocidade de condução nervosa. Porém, a recuperação completa raramente é alcançada (Verdú et al, 2000).

## 2.4 Respostas do Músculo à Desnervação

A desnervação causa perda imediata das atividades motora e reflexa do músculo e, conseqüentemente, atrofia progressiva durante as semanas que sucedem a lesão, podendo ocasionar alterações permanentes nas fibras musculares e no tecido conjuntivo, além de uma série de mudanças fisiológicas, bioquímicas e funcionais (Bishop, 1982; Deschenes, Maresh e Kraemer, 1997).

Esse comprometimento é seguido por degeneração das fibras e substituição por tecido fibroso ou adiposo, resultando em incapacidade para a realização das funções musculares. Jaweed, Herbison e Dittuno (1975) citam que a desnervação do músculo sóleo de ratos proporciona aumento na proporção de fibras tipo II, com diminuição de fibras do tipo I, sugerindo transformação dos tipos de fibra muscular, o que contribui para o aumento da fatigabilidade (Deschenes, Maresh e Kraemer, 1997; Ferreira et al., 2004).

A desnervação provoca também a redução na sensibilidade à insulina e na atividade das vias reguladoras do metabolismo da glicose. Além disso, diminui a captação da glicose, a expressão gênica dos transportadores GLUT-1 e GLUT-4 e o metabolismo muscular da glicose, os quais também podem desencadear o processo de atrofia muscular (Silva et al., 1999; Polacow et al., 2003; Coderre et al., 1992 apud Forti et al., 2004).

De acordo com o tipo de lesão nervosa periférica, a alteração evidente no músculo será transitória ou permanente, sendo que na neuropraxia, as alterações são mais leves, enquanto que nas situações de axoniotmese e neurotmesa são mais evidentes.

Em relação ao tempo necessário à regeneração do nervo isquiático em ratos após esmagamento, existem diversos estudos experimentais na literatura científica. Devor et al. (1979) relatam que a recuperação funcional do nervo isquiático após esmagamento em ratos tem início no 4º dia após a lesão e que, em torno do 20º dia, já se evidencia retorno importante da sensibilidade nos territórios comprometidos pela lesão. Mira (1979) cita que as fibras regeneradas do nervo isquiático de ratos após lesão por esmagamento estão presentes entre o 10º e 15º dia, com retorno da normalidade no 2º mês.

Em outros estudos, Gorio et al., (1983) e Carmignoto et al., (1983) afirmam que 25% das fibras musculares já estão poliinervadas em aproximadamente 15 dias após o esmagamento do nervo isquiático, alcançando o máximo entre 21 e 25 dias. Em seguida, os contatos sinápticos excessivos começam a ser eliminados (eliminação sináptica), pois a concentração dos fatores neurotróficos diminui devido ao restabelecimento das características biofísicas do músculo, tornando a fibra monoinervada no 60º dia, sendo que em 90 dias a fibra muscular recupera suas condições normais.

O crescimento axonal em ratos após axoniotmese é, em média, de 3 a 4 mm/dia (Gorio et al., 1983), porém, após neurotmese, a velocidade média é de 2,5 mm/ dia (Stoll e Muller, 1999), enquanto que para o homem este crescimento é de, em média, 1 a 2 mm/dia (Stoll e Muller, 1999; Gordon, Sulaiman e Boyd, 2003).

## 2.5 Avaliação Funcional da Marcha

Para avaliar a função após esmagamento do nervo isquiático, De Medinacelli, Freed e Wyatt (1982) propuseram um método não invasivo, denominado de IFC, que apresenta boa confiabilidade e reprodutibilidade quando comparado a outros previamente utilizados, como análise eletrofisiológica do nervo e do músculo e de transporte axonal.

Este método foi modificado por Bain, Mackinnon e Hunter (1989) e Hare et al. (1992), com a finalidade de aprimorá-lo e de avaliar a função de outros nervos após esmagamento, transecção e reparo. Esses pesquisadores observaram que o grau de recuperação funcional depende do nervo envolvido, sendo que o nervo isquiático apresenta 41% de recuperação após transecção, enquanto o tibial apresenta 54% e o fibular 100%, após 52 dias do reparo cirúrgico (Hare et al., 1992; Varejão et al., 2001). Essa variabilidade na recuperação funcional se deve à relativa complexidade dos nervos envolvidos, que possuem fibras sensoriais, motoras e simpáticas, havendo conexões inapropriadas entre as fibras regeneradas (Hare et al., 1992). Entretanto, esses autores afirmam que, quando a lesão ocorre por esmagamento do nervo isquiático e tibial, a recuperação é completa.

O instrumento de avaliação consta de um corredor, medindo 42 cm de comprimento e 8,2 cm de largura, sendo que em uma de suas extremidades se localiza uma caixa escura (De Medinaceli, Freed e Wyatt, 1982). O animal é colocado no corredor e, após duas ou três passagens do animal pelo corredor para reconhecimento do ambiente, posiciona-se uma tira de papel branco ou

papel fotográfico sobre o assoalho do corredor, para registro das pegadas (Dijkstra et al., 2000; Varejão et al., 2004).

Em seguida, as patas posteriores do animal são marcadas com tinta preta de impressão digital e este é posicionado no início do corredor, por onde caminha em direção ao ambiente escuro, deixando impressas as faces plantares das patas traseiras experimental (lesado) e normal (De Medinaceli, Freed e Wyatt, 1982; Varejão et al., 2001; 2003; 2004).

Para mensuração das imagens das pegadas, coleta-se a distância do terceiro dedo ao calcanhar (PL), o afastamento dos dedos, ou seja, a medida do 1º dedo ao 5º dedo (TS) e o afastamento dos dedos intermediários, ou seja, a distância do 2º dedo ao 4º dedo (ITS) da pata normal (N) e experimental (E) (Bain, Mackinnon e Hunter, 1989; Varejão et al., 2001; 2003; 2004).

A medição desses parâmetros pode ser realizada manualmente ou por meio de um programa de computador (Bain, Mackinnon e Hunter, 1989; Varejão et al., 2001; Selli 1998 apud Endo, 2002). Os dados obtidos por meio desse registro das pegadas são introduzidos na seguinte equação, de acordo com De Medinacelli, Freed e Wyatt (1982) e adaptada por Bain, Mackinnon e Hunter (1989):

$$IFC = - 38.3 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 109.5 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} + 13.3 \times \frac{EIT - NIT}{NIT} - 8.8$$

Os resultados obtidos na fórmula expressam que o valor 0, representa uma função normal e o valor -100, uma perda funcional significativa (Varejão et al., 2001; 2003; 2004).

## **2.6 Exercício Físico e Regeneração Nervosa Periférica**

O exercício físico é capaz de múltiplos ajustes fisiológicos, sendo que nenhuma outra atividade proporciona tamanha sobrecarga aos sistemas biológicos (Gallo et al., 1995), podendo ser utilizado na clínica terapêutica para o tratamento de doenças, prevenção de atrofia muscular, ganho de amplitude de movimento e recuperação da motricidade, além de favorecer o equilíbrio metabólico.

Para Herbison e Gordon (1973b), o exercício estimula significativas mudanças histológicas, bioquímicas e funcionais no músculo, como o aumento da massa muscular, dos capilares sanguíneos, do número e tamanho da mitocôndria, entre outras. Para Seo et al. (2006), a atividade física induz alterações no sistema nervoso central (facilita o aprendizado e a memória) e periférico (acelera a regeneração axonal).

O aumento da atividade contrátil, considerando diferentes tipos e intensidades de exercício, favorece também um aumento do GLUT-4. Estes dados sugerem que a prática regular de exercício eleva a captação de glicose pelas fibras musculares (Forti et al., 2004).

Considerando os benefícios do exercício, diferentes formas de treinamento em ratos estão sendo estudadas por diversos pesquisadores, com a finalidade de aumentar e acelerar a recuperação funcional do músculo após lesão

nervosa periférica (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; Crockett e Edgerton, 1975; Van Meeteren et al., 1997; Seo et al., 2006).

Vecchi (1929), citado por Van Meeteren et al. (1997) foi o primeiro a tentar estimular a regeneração de nervo esmagado em ratos, utilizando a esteira ergométrica. Apesar da data da primeira publicação utilizando esse recurso para o tratamento das lesões nervosas, observa-se uma escassez de dados na literatura atual relacionados ao impacto da atividade física na fase inicial da desnervação.

Além da escassez de pesquisas, existem diversos dados controversos na literatura, provavelmente decorrentes do uso de diferentes protocolos de treinamento, uma vez que a qualidade dos ajustes fisiológicos da atividade física, tanto no homem com no animal, depende basicamente das características do treinamento físico, como natureza, intensidade, duração e frequência do exercício (Seo et al., 2006).

Assim, Herbison, Jaweed e Ditunno (1974, 1980a) relatam não haver estudos que definam a intensidade ou tempo ideais para iniciar o exercício, mas afirmam ser a fase de reinervação a melhor fase, uma vez que o dano muscular pode ocorrer durante a fase de desnervação quando o número de unidades contráteis é insuficiente ou quando o exercício é de alta intensidade.

Com a intenção de demonstrar que o exercício realizado durante duas horas, imediatamente após a lesão do nervo isquiático, inibe o processo de reinervação, diminuindo as propriedades contráteis do músculo, Herbison, Jaweed e Ditunno (1974) propuseram um protocolo de treinamento no qual a natação era iniciada na 3<sup>o</sup> semana (o que consideraram fase imediata) com duração de três semanas, onde um grupo nadava durante uma hora e outro durante duas horas. Outros dois grupos iniciavam a natação na 4<sup>o</sup> semana (o que

consideraram fase tardia) após desnervação, treinando por duas semanas, durante uma e duas horas, respectivamente. O grupo que realizou exercício no início da reinervação (3<sup>o</sup> semana) durante duas horas apresentou diminuição da concentração total de proteína muscular devido à presença de poucas unidades contráteis após a desnervação e a alta intensidade de atividade.

Em 1980a, Herbison, Jaweed e Ditunno repetiram um protocolo semelhante ao anterior para ratos submetidos a axoniotmese, porém utilizando esteira. O exercício não alterou o diâmetro da fibra muscular, nem a reinervação do músculo, mas aumentou a proporção de fibras tipo II na região profunda do músculo plantar, sugerindo que as alterações ocorrem de acordo com o programa específico de exercício físico.

Hie, Van Nie e Vermeulen-Van der Zee (1982) optaram também por um programa de treinamento similar, em que ratos desnervados realizavam exercícios em esteira (inclinação de 25% e velocidade de 12 m/min por duas horas/dia durante 18 semanas) após 18 dias da secção do nervo isquiático, afirmando que o exercício dinâmico nessa fase de reinervação ocasiona efeitos positivos no peso, na contração e nas características histológicas do músculo, proporcionando condições fisiológicas favoráveis para a recuperação funcional.

Cinco anos mais tarde, em 1987, os mesmos autores refizeram o estudo com objetivo de avaliar se a recuperação funcional do músculo estava sendo acompanhada com o aumento da capacidade oxidativa. Concluíram que o protocolo de esteira utilizado não altera a reinervação e a distribuição das fibras musculares, nem ocasiona danos musculares.

Apesar desses estudos, Van Meeteren et al. (1997) relataram que a atividade física na fase de desnervação aumenta o retorno da função sensório-



motora e esse resultado persiste na fase tardia da reinervação, apontando que o exercício 24 horas após a lesão por esmagamento do nervo isquiático apresenta benefícios para o crescimento axonal, recuperação das propriedades contráteis do músculo e maturação do nervo. Para obter esses resultados na fase tardia, os animais experimentais foram observados aos 50, 75, 100, 125 e 150 dias após a lesão, obtendo-se dados eletrofisiológicos. Aos 150 dias, a velocidade de condução do nervo motor era significativamente melhor nos grupos treinados do que no grupo controle.

Em outro estudo semelhante, Byun et al. (2005) submeteram ratos a exercício na esteira após 72 horas do esmagamento do nervo isquiático, na velocidade de 8 m/min e inclinação de 0%, por 30 minutos, uma vez ao dia, durante 12 dias consecutivos. Concluíram que o exercício foi efetivo na recuperação funcional, aumentando os valores do IFC e inibindo a expressão do mRNA do BDNF.

Marqueste et al. (2004) ressaltaram que o exercício na esteira, aproximadamente uma semana após neurotmesa e reparo cirúrgico, proporciona benefícios, como o aumento da resistência à fadiga, recuperação das propriedades contráteis e da mecano-sensibilidade do músculo.

Em estudo recente, Seo et al. (2006) submeteram ratos a treinamento na esteira após 12 horas do esmagamento do nervo isquiático, em velocidade de 18 m/min e 0% de inclinação, por 30 minutos, duas vezes ao dia, durante 3-14 dias. Observaram que o exercício na esteira acelera a regeneração axonal e consequente recuperação motora funcional por meio do IFC.

Além da discussão sobre a melhor fase para realizar o exercício físico, o estresse promovido pelos estímulos negativos, como o choque elétrico por meio

de esteiras equipadas com grade e o afogamento, na natação, para incentivar os ratos a realizarem os exercícios, pode afetar os resultados dos experimentos, comprometendo a recuperação funcional (Irintchev, Draguhn e Werning, 1990; Irintchev, Carmody e Werning, 1991). Apesar disso, diversos estudos citam a utilização de ameaça de afogamento (Gutmann e Jakoubek, 1963) e choque elétrico (Herbison, Jaweed e Dittuno, 1980a; 1980b; Hie, Van Nie e Vermculen-Van der Zee, 1982; Seo et al., 2006) para motivar os ratos a realizarem o exercício.

A frequência do exercício é outra variável bastante discutida. Deschenes, Maresh e Kraemer (1997) afirmam que a frequência moderada de cinco dias/semana de exercício na esteira (velocidade de 24 m/min e inclinação de 0%) por seis semanas, não é suficiente para alterar os efeitos da desnervação sobre a morfologia muscular (tamanho e tipo da fibra muscular). Entretanto, Sakakima et al. (2004) concluíram que a corrida realizada na frequência de três e de seis vezes por semana traz benefícios para recuperação da atrofia e contratura muscular em ratos previamente imobilizados quando comparado a frequência de uma vez por semana e a um grupo que não realizou exercício.

Diante da variabilidade de fatores envolvidos com o exercício físico no processo de regeneração nervosa, deve-se fazer uma prescrição adequada e segura do exercício, onde programas de tratamento devem ser baseados no limiar de anaerobiose para serem propostos, a fim de obter baixos riscos de intercorrências durante a realização do mesmo.

O limiar de anaerobiose (LA) pode ser definido como a intensidade do exercício sobre o qual a produção de energia pelo mecanismo aeróbio é suplementada pelo mecanismo anaeróbio, o qual fornece importantes

informações acerca dos principais sistemas fisiológicos envolvidos na realização do exercício físico (Wasserman et al., 1999).

Assim, o acúmulo do lactato sanguíneo depende da duração e da intensidade do exercício, sendo que o aumento desta ocasiona um crescimento exponencial na concentração do lactato (Wasserman et al., 1999). No caso de esteira para ratos, a intensidade do treinamento é considerada pela velocidade, enquanto na natação, é considerada pela adição de cargas progressivas à cauda ou tórax do animal (Pills et al., 1993; Langfort et al., 1996).

A produção de lactato em excesso pode, por inibição da via glicolítica, impedir o desempenho e contribuir para fadiga, além de prejudicar as propriedades de contratilidade muscular, por interferir na condutibilidade elétrica da membrana e na atividade metabólica, modificando variáveis fisiológicas e bioquímicas (Montgomery, 1990).

Pills et al. (1993) realizaram um protocolo de determinação de limiar anaeróbio (Lan) para ratos, onde mediram o nível de lactato em repouso, e iniciaram a corrida a 13 m/min, com 10° de inclinação, durante 3 minutos. Em seguida, retiraram os ratos da esteira para uma imediata dosagem e, após 3 minutos, recolocaram-nos na esteira com um incremento de 4 m/min até atingirem 33 m/min. Neste estudo, percebeu-se que os ratos a 10% de inclinação com 25 m/min de velocidade na esteira, produzem mais lactato, acumulando íons de hidrogênio no músculo e no sangue, diminuindo o pH sanguíneo e cessando o exercício por acidose num intervalo muito pequeno. Os autores definiram a velocidade de 17 m/min como sendo a de equilíbrio entre a produção e remoção do lactato para ratos normais em esteiras.

Utilizando outro protocolo para ratos, Machado et al. (2005) afirmaram que o lactato sanguíneo está estabilizado na velocidade de 15 m/min e a concentração de lactato começa a se elevar na velocidade de 20 m/min, sendo que a partir desta velocidade há um aumento progressivo da concentração de lactato. Entretanto, até o momento não foi encontrado na literatura dados que determinem o Lan para ratos desnervados na esteira.

Apesar disso, Herbison, Jaweed e Ditunno (1982) relatam um protocolo de esteira com inclinação de 35% e velocidade de 27 m/min após duas ou três semanas da lesão por esmagamento do nervo isquiático em ratos, afirmando que o estímulo do treinamento aumenta a porcentagem da fibra tipo II, sem causar danos durante a reinervação. Para Van Meeteren et al. (1997), esse protocolo não traz benefícios, uma vez que a sobrecarga do treinamento é prejudicial para a pata sadia do rato, causando danos musculares.

Considerando que os dados disponíveis na literatura atual sobre a utilização do exercício físico como recurso para facilitar a regeneração e a recuperação funcional após lesão nervosa periférica são contraditórios, este estudo investigou a influência do exercício físico iniciado imediata e tardiamente após a lesão sobre o processo de regeneração nervosa em ratos, visando subsidiar discussões relacionadas ao tratamento de lesões nervosas periféricas na clínica fisioterapêutica.

### **3 OBJETIVOS**

Analisar comparativamente a influência do exercício em esteira aplicado na fase imediata e tardia da regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese, por meio de análise morfométrica e funcional.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal de São Carlos, sob protocolo nº 027/2006 (anexo 1).

### 4.2 Local e Condições Ambientais do Estudo

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Plasticidade Neuromuscular, do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP).

Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, com água e ração comercial “*ad libitum*”, sob temperatura controlada e ciclo automático de iluminação de 12 horas claro e 12 horas escuro.

### 4.3 Grupos Experimentais

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, com idade entre 6 e 7 semanas, pesando ( $229,05 \pm 18,02$  gramas), procedentes do Biotério Central da UNIMEP. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=5):

**Grupo I - Controle (CON):** animais sem qualquer intervenção.

**Grupo II - Desnervado (D):** animais submetidos à lesão por esmagamento do nervo isquiático e mantidos na gaiola durante 33 dias.

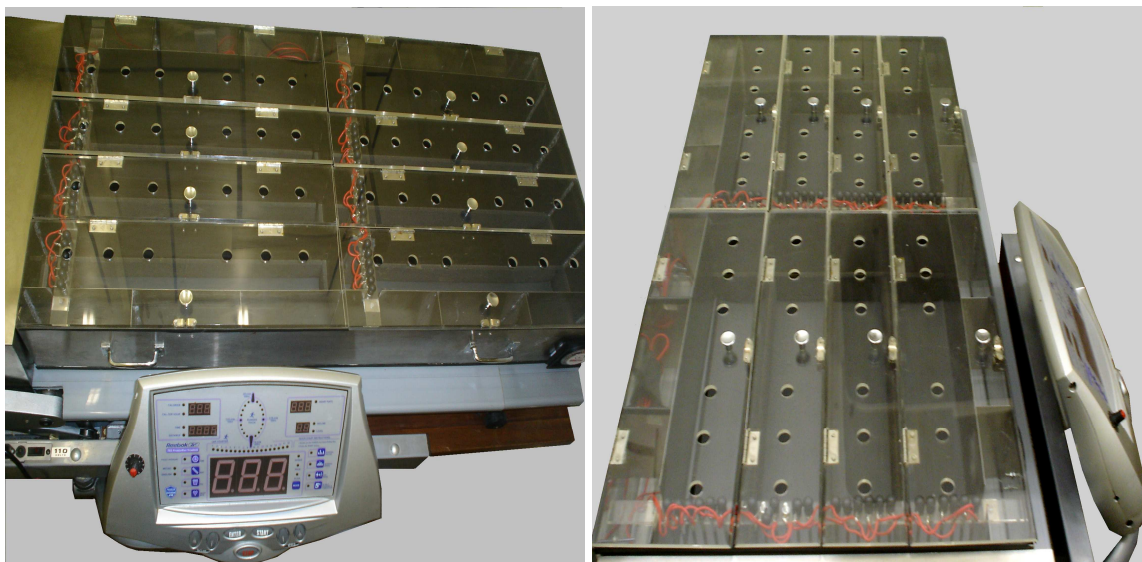
**Grupo III - Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG):** animais submetidos ao treinamento após 24 horas da lesão durante 14 dias, mantidos na gaiola por 14 dias e sacrificados no 33º dia.

**Grupo IV - Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE):** os animais iniciaram treinamento no 14º dia após a lesão nervosa, sendo sacrificados no 33º dia.

Os animais dos grupos III e IV realizaram exercício na esteira ergométrica por cinco dias sucessivos na semana, respeitando os finais de semana, sendo que cada grupo realizou 14 dias de atividade física.

#### **4.4 Seleção dos Animais para Exercício em Esteira**

Cinquenta animais foram submetidos a um processo de seleção durante uma semana, em esteira ergométrica da marca *REBOOK TR2 PREMIERRUN TREADMILL*® (Figura 1), para a seleção de 10 animais corredores natos. O critério para identificação dos corredores natos foi apresentar capacidade para correr de cinco a dez minutos em velocidade de 17 m/min (Pills et al., 1993; Gobatto et al., 2001; Machado et al., 2005).



**Figura 1** – Vista superior da esteira ergométrica *REBOOK TR2 PREMIERRUN TREADMILL*®

#### **4.5 Adaptação dos Animais**

Os animais selecionados foram adaptados na esteira antes de iniciar o experimento. O protocolo de adaptação consistiu em colocar os animais na esteira por uma semana, sem inclinação, com velocidade de 17 m/min, mas com aumento progressivo do tempo de corrida até alcançar 30 minutos (Pills et al., 1993; Machado et al., 2005).

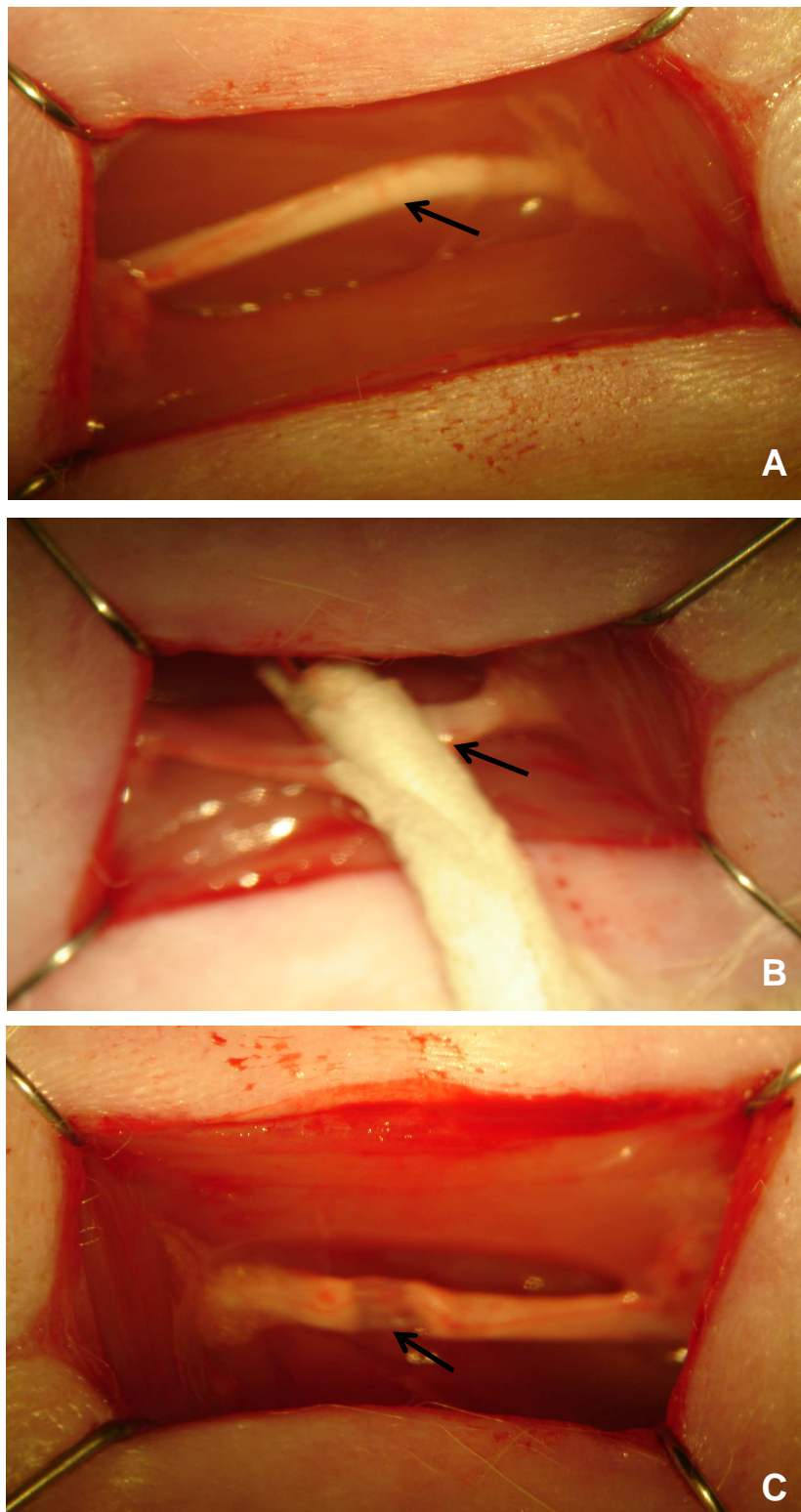
#### **4.6 Lesão Nervosa**

Os animais submetidos à cirurgia para esmagamento do nervo isquiático receberam anestesia intramuscular de uma mistura de Ketalar® (Cloridrato de Ketamina - 50 mg/mL) e Rompum® (Cloridrato de Tiazina - 2g/100 mL), na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100g do peso corporal.



A seguir, os ratos foram tricotomizados na região glútea esquerda, onde se realizou uma incisão de aproximadamente 1,5 cm sobre a pele para exposição dos planos musculares, que foram afastados até a visualização do nervo isquiático (Figura 2A). O nervo foi delicadamente separado do tecido conjuntivo ao redor e esmagado com pinça hemostática adaptada *ERWIN GUTH*<sup>®</sup> de 12 cm, por quatro pinçamentos de 20 segundos e intervalo de um segundo entre eles, de acordo com Fernandes et al. (2005), sendo padronizada a compressão até o 3º dente da cremalheira (Figura 2B). Para todos os animais, o esmagamento foi feito pelo mesmo indivíduo. A Figura 2C mostra o aspecto macroscópico do nervo, imediatamente após a lesão.

Em seguida, os planos muscular e cutâneo foram fechados com fio de sutura Ethicon 6-0.



**Figura 2** – A: Nervo isquiático exposto (seta); B: Esmagamento do nervo (seta); C: Aspecto macroscópico do nervo após esmagamento (seta).

Após recuperação anestésica, administrou-se 4µL de dipirona sódica (500 mg/mL) por via oral, com efeito analgésico e PVP (Povidine) – I 10% (uso tópico) no local da incisão, a cada 12 horas, no primeiro e segundo dia pós-operatório.

#### **4.7 Realização do Exercício Físico**

Os animais foram treinados em esteira ergométrica *REBOOK TR2 PREMIERRUN TREADMILL*<sup>®</sup> adaptada para ratos, com oito raias. O treinamento ocorreu durante 30 minutos/dia, 5 vezes por semana, com velocidade de 8 m/min e inclinação de 0%, por um período de 14 dias (período vespertino), respeitando-se os finais de semana.

Os animais dos grupos DEG foram submetidos ao treinamento em esteira após 24 horas da lesão nervosa (fase imediata), enquanto que o grupo DGE iniciou treinamento no 14<sup>o</sup> dia após a lesão (fase tardia).

Para reduzir o estresse dos animais durante o treinamento, o dispositivo que transfere corrente elétrica para motivar os ratos a correr não foi utilizado, sendo o estímulo substituído por uma “espátula” de material plástico, conforme mostra a Figura 3.



**Figura 3** – Vista geral dos animais durante treinamento em Esteira ergométrica *REBOOK TR2 PREMIERRUN TREADMILL*®, com estímulo da espátula (A).

#### 4.8 Processamento do Nervo

Após 30 dias da lesão nervosa, os animais de todos os grupos foram anestesiados conforme citado anteriormente e tiveram o nervo isquiático esquerdo 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.

Em seguida, a porção distal do nervo isquiático foi retirada e os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os fragmentos do nervo foram mantidos em solução fixadora (Karnovsky) por 24h e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.3, por duas horas, imersos em uranila 5% durante 24h, para coloração em bloco, desidratados em soluções crescentes (30% a 100%) de acetona e incluídos em resina Araldite (UEGAMA).

Foram obtidos cortes transversais de 1 $\mu$ m da porção distal do nervo com navalha de vidro, em ultramicrótomo LKB, que foram corados com azul de toluidina a 1%, em solução aquosa de bórax a 1%, para microscopia óptica (Reynolds, 1963 apud Teodori, 2000).

#### 4.9 Análise Morfométrica

As lâminas histológicas foram observadas em microscópio de luz (modelo ZEISS, Standard 25) acoplado a um sistema analisador de imagens que utiliza o software *IMAGE PRÓ-PLUS – 4.0 MEDIA CYBERNETICS*<sup>®</sup>.

A calibração do sistema de análise de imagens para obtenção de medidas na unidade de micrômetros ( $\mu$ m) foi realizada com o auxílio de uma lâmina micrometrada (ZEISS 5<sub>+100/100</sub> mm).

Analisou-se um corte por nervo de cada animal, do qual foram obtidas imagens em objetiva de 10X, para determinação da área do nervo e em objetiva de 100X, para seleção dos campos da amostra (5 campos aleatoriamente definidos em cada corte), sendo analisadas aproximadamente 400 fibras nervosas mielinizadas.

Em seguida, a imagem de cada campo foi captada pelo sistema e visualizada *on line* no *display*, para realizar a normalização e congelamento da imagem, para se obter o número de axônios, diâmetro da fibra e do axônio.

As medidas foram realizadas de forma semi-automática, sendo que em cada fibra nervosa mielinizada foram obtidos valores (em micrômetros) do diâmetro do axônio e da fibra nervosa. Os valores da espessura da bainha de

mielina e da razão G foram calculados a partir dos dados do diâmetro do axônio e diâmetro da fibra nervosa.

Considerando que as imagens foram obtidas em câmera de vídeo JVC modelo TK-C620U e em câmera digital OLYMPUS – C-5050, 5.0 megapixels, com resolução de 2560 x 1920 dpi, acoplada a fotomicroscópio OLYMPUS BX 4.1, utilizou-se um fator de correção para calibração do software analisador de imagens. Esse fator de correção foi obtido circulando-se os diâmetros internos e externos dos mesmos axônios em imagens obtidas nas duas câmeras:

Diâmetro externo obtido em imagem da câmera JVC =  $x \mu\text{m}$

Diâmetro externo obtido em imagem da câmera OLYMPUS =  $y \mu\text{m}$

Fator de correção =  $\frac{x \mu\text{m}}{y \mu\text{m}} = Z$

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

A seguir, o diâmetro médio dos axônios de cada animal foi obtido a partir da somatória dos diâmetros dos axônios, dividido pelo número de axônios mensurados. O cálculo do diâmetro da fibra seguiu a mesma lógica.

Os valores de espessura das bainhas de mielina foram obtidos subtraindo-se o diâmetro do axônio do diâmetro da fibra e, em seguida, dividindo-se por dois. Já o valor da razão G foi calculado pela divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa.

A espessura média das fibras também foi obtida dividindo-se a somatória das espessuras das bainhas de mielina pelo número de fibras nervosas analisadas.

## 4.10 Análise Quantitativa

### 4.10.1 Número de Axônios

O número total de axônios em cada nervo foi calculado a partir da somatória do número de axônios obtidos em 5 campos, em objetiva de 100X. Para isso, foi estabelecida a proporção entre a área da amostra 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, respectivamente:

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

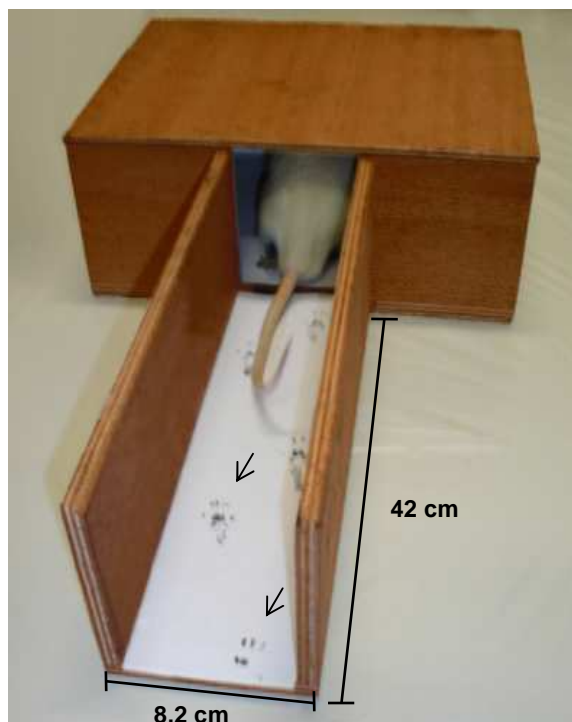
$$\text{Número total de axônios: } \frac{\sum \text{número axônios} \times 100}{\% \text{ amostra}}$$

## 4.11 Análise Funcional da Marcha

As impressões das pegadas dos ratos para realizar o Índice Funcional do Ciático (IFC) foram feitas de acordo com De Medinacelli, Freed e Wyatt (1982). Para isso, foi construída uma passarela (8,2 x 42 cm) com um abrigo escuro na extremidade (Figura 4). Considerando a tendência dos ratos em se direcionar para locais com menor luminosidade, quando colocados no início da passarela, percorrem seu trajeto até a caixa escura.

Após treino inicial, os animais foram colocados para caminhar na passarela revestida com papel sulfite, com as patas posteriores marcadas com

tinta de impressão digital, a fim de realizar o registro das impressões plantares das patas normal e experimental.

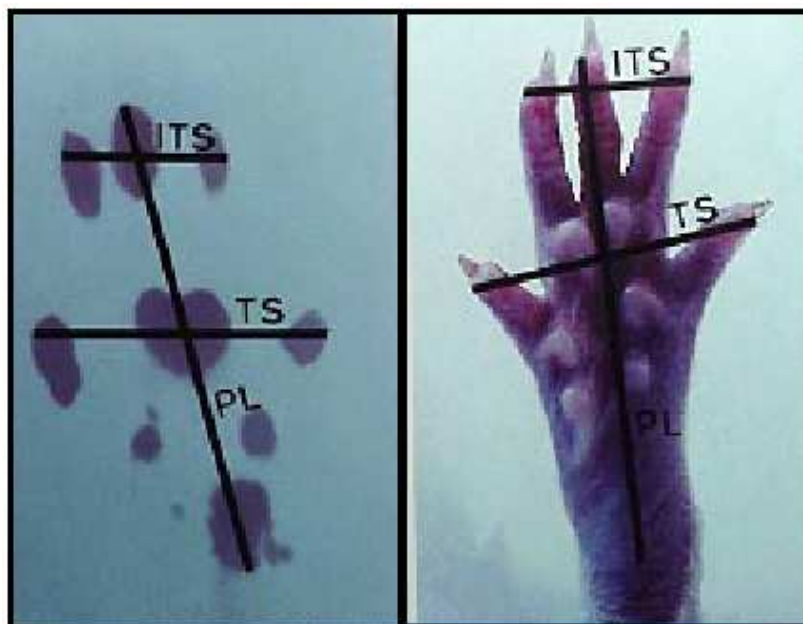


**Figura 4** - Instrumento utilizado para obtenção das impressões plantares referentes ao IFC. Pegadas do animal (seta).

Em seguida, foram obtidas as distâncias descritas a seguir, conforme mostra a Figura 5.

1. Entre a extremidade do terceiro dedo e o calcâneo - Comprimento da pegada (PL);
2. Entre o primeiro e o quinto dedo - Largura da pegada (TS);
3. Entre o segundo e quarto dedo - Largura intermediária da pegada (ITS).





**Figura 5** - Parâmetros de medidas de comprimento para o cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC). Fonte: Varella et al. (2004).

As medidas foram tomadas das patas experimental (E) e normal (N), por meio de um paquímetro digital da marca *MITUTOYO*<sup>®</sup>. Os valores obtidos foram aplicados na equação proposta por Bain, Mackinnon e Hunter (1989), antes (pré-operatório) e após o 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias da cirurgia de esmagamento do nervo isquiático.

Os resultados obtidos dessa equação 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.

#### **4.12 Análise Estatística**

A análise de distribuição dos dados de todas as variáveis estudadas nas diferentes condições mostrou distribuição normal, utilizando-se o teste Shapiro-Wilk. Testes estatísticos paramétricos foram escolhidos para comparação dos dados.

Para análise morfométrica foi realizado o teste Anova - F (One-Way) seguido de Tukey e, para análise funcional da marcha, o teste Anova - F (Two-Way) foi realizado para avaliar cada grupo, nos diferentes períodos de avaliação (comparação intragrupos) e o teste Anova F (One-Way) seguido de Tukey, para comparar os grupos entre si (comparação intergrupos). Utilizou-se o teste de correlação de Pearson para análise dos dados morfométricos e funcionais.

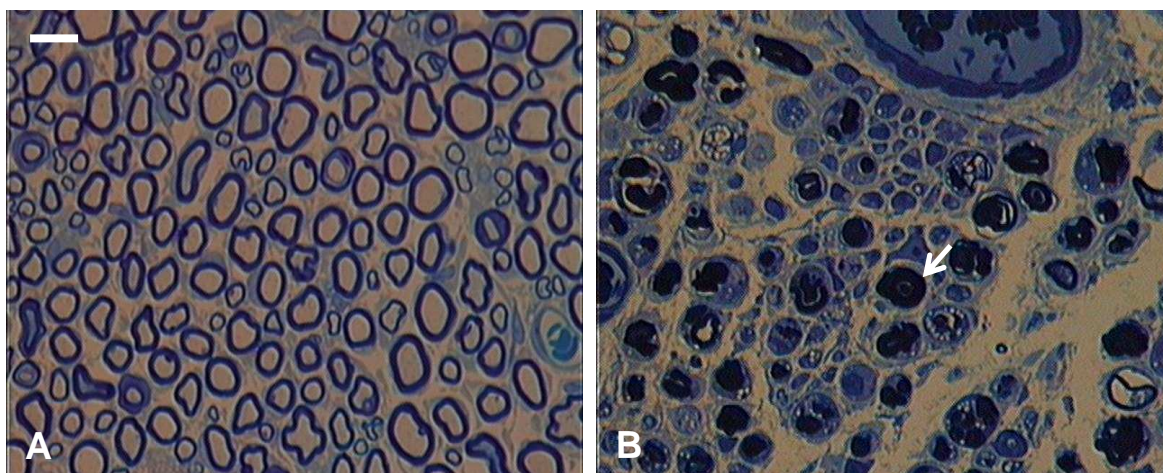
O nível de significância estabelecido em todos os testes estatísticos foi de 5%, sendo todos os procedimentos realizados a partir do aplicativo "BioEstat 4.0" e o "SPSS 11.0". Os valores foram expressos em média e desvio padrão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Esmagamento do Nervo Isquiático

Em estudo piloto realizado no Laboratório de Pesquisa em Plasticidade Neuromuscular do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), 5 animais desnervados foram sacrificados após 6 dias da lesão, com a finalidade de comprovar a eficácia do protocolo utilizado para produzir lesão nervosa do tipo axoniotmese.

Todos os animais apresentaram intenso processo de degeneração axonal, com evidente retração e desintegração das bainhas de mielina (Figura 6).



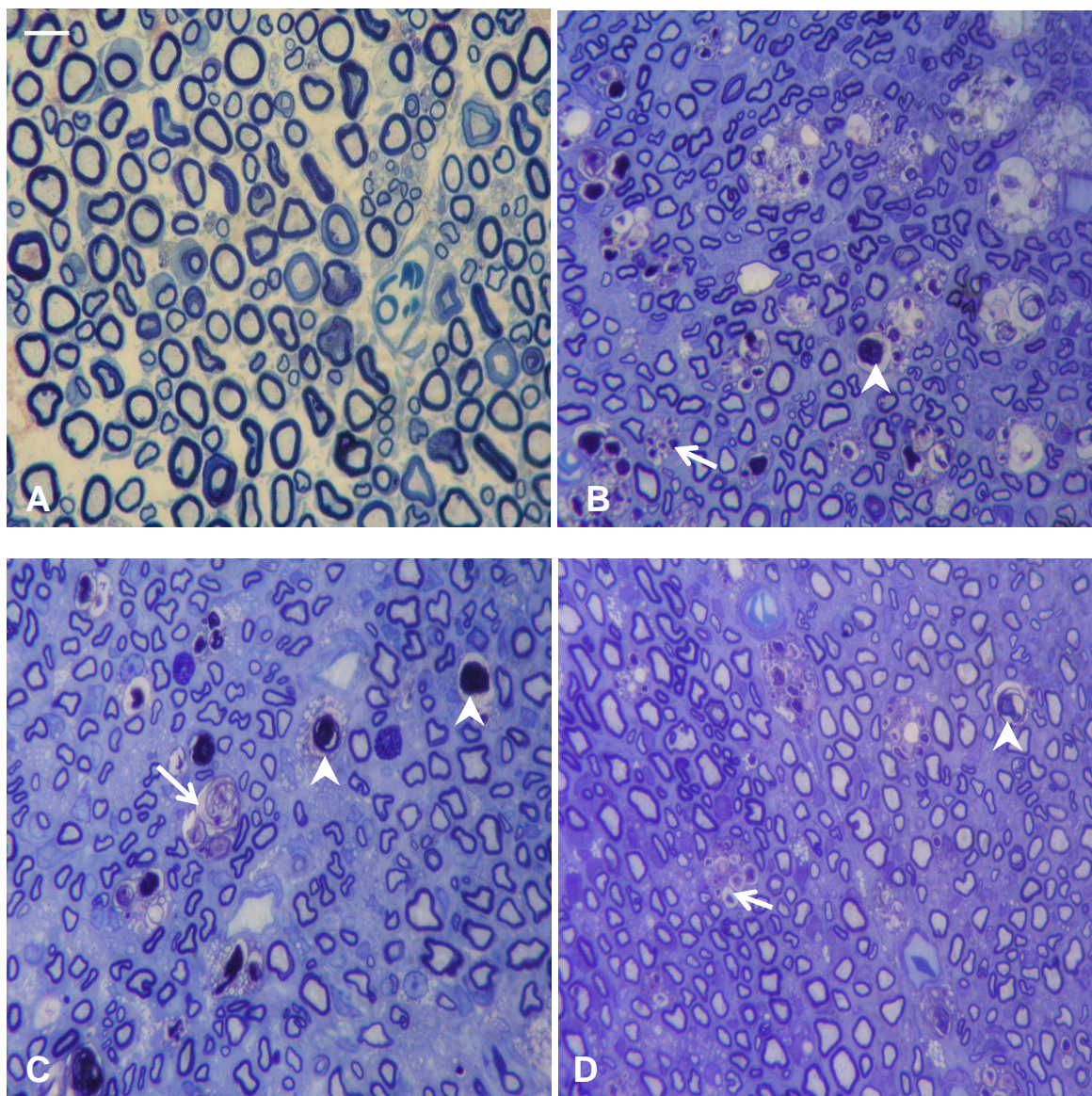
**Figura 6** – Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático: A- nervo normal; B- após 6 dias da lesão por esmagamento, observando-se degeneração axonal com retração e desintegração da bainha de mielina (seta). Barra = 10  $\mu$ m. Coloração: Azul de Toluidina.

## 5.2 Análise Histológica

Na figura 7 expressam-se as características histológicas entre os grupos experimentais: CON, D, DGE e DEG.

No grupo CON (Figura 7A) foram observados axônios de diferentes tamanhos, enquanto no grupo D (Figura 7B) observou-se aumento do número de axônios e diminuição do diâmetro das fibras.

Nos grupos DEG (Figura 7C) e DGE (Figura 7D), também se observam axônios com diâmetros variados e reduzidos, havendo aparentemente maior número de fibras com menor calibre e bainhas de mielina mais delgadas, quando comparado ao grupo controle. Axônios degenerados e macrófagos são observados nos grupos desnervados.

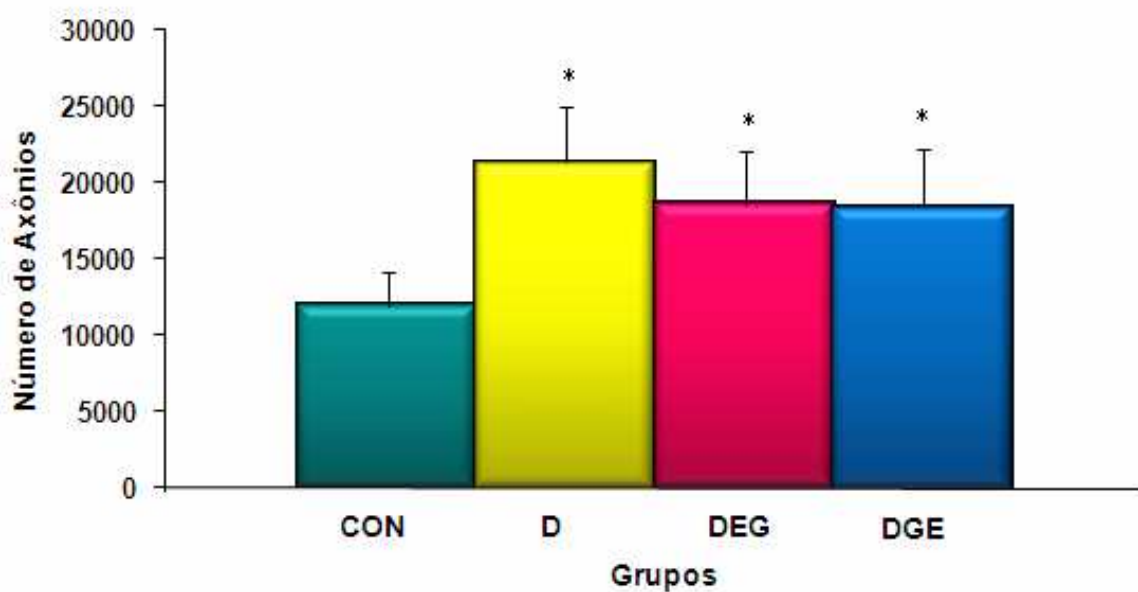


**Figura 7** - Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático: Controle (A); Desnervado (B); Desnervado + Exercício + Gaiola (C); Desnervado + Gaiola + Exercício (D). Observar axônios em degeneração (cabeça de seta) e macrófagos (seta). Barra = 10  $\mu$ m. Coloração: Azul de Toluidina.

### 5.3 Análise Quantitativa

#### 5.3.1 Número de Axônios

A figura 8 expressa o número de axônios nos diferentes grupos estudados. Esse número foi maior nos grupos D ( $21345 \pm 2372$ ), DEG ( $18591 \pm 2305$ ), DGE ( $18436 \pm 2520$ ) que no grupo CON ( $11976 \pm 1439$ ) ( $p < 0,05$ ).

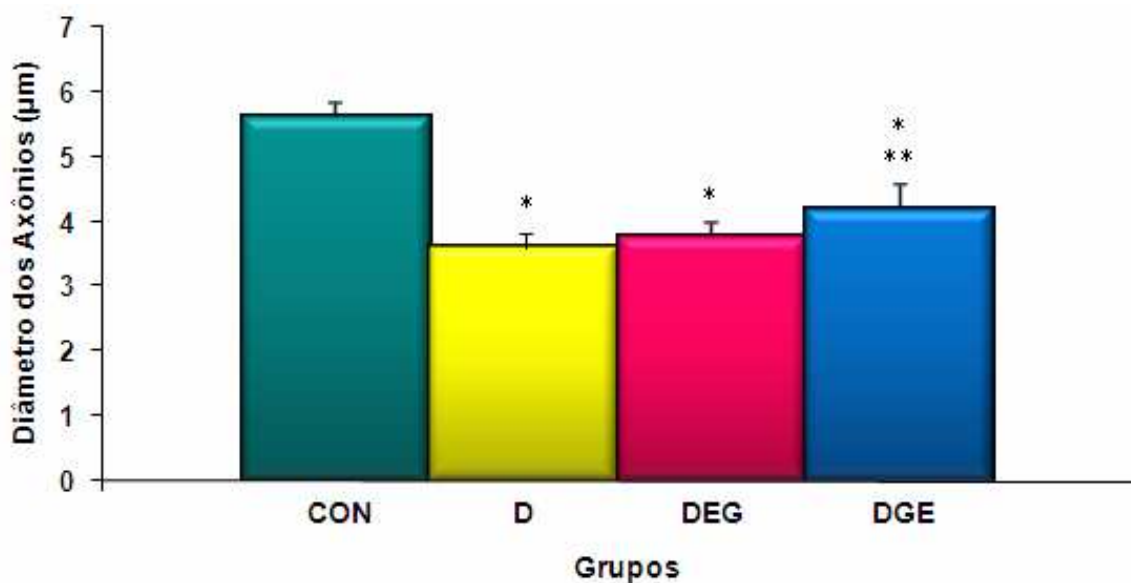


**Figura 8** - Número de axônios nos grupos: Controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG) e Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE). (\*) Difere do grupo CON ( $p < 0,05$ ).

## 5.4 Análise Morfométrica

### 5.4.1 Diâmetro dos Axônios

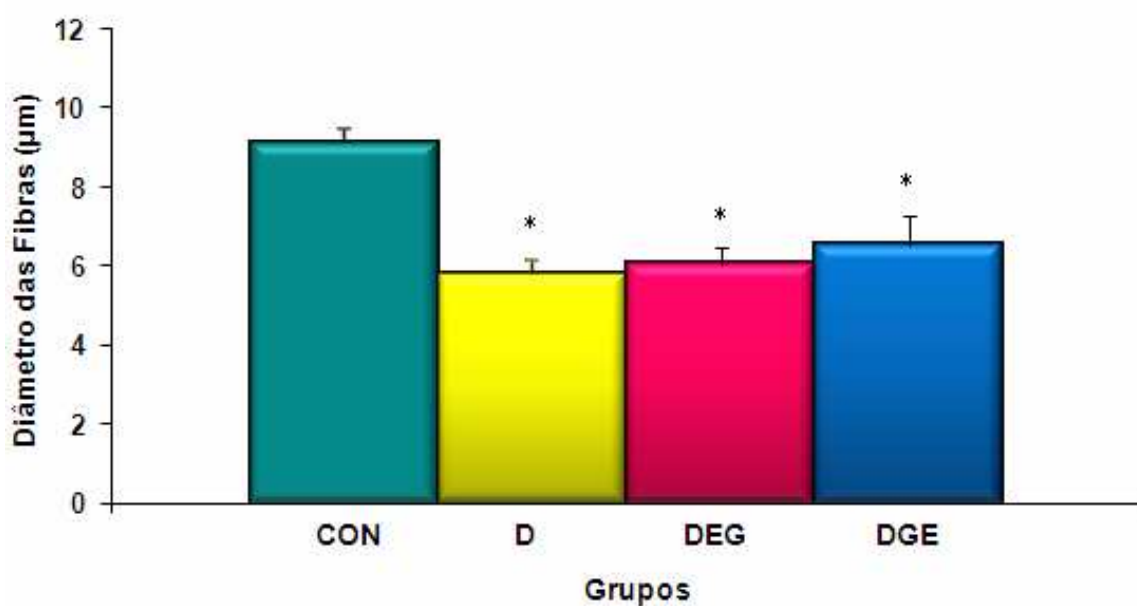
O diâmetro dos axônios nos grupos desnervados: D ( $3,60 \pm 0,23$ ), DEG ( $3,77 \pm 0,18$ ) e DGE ( $4,18 \pm 0,36$ ) foi sempre menor que no grupo CON ( $5,62 \pm 0,19$ ) ( $p < 0,01$ ). No grupo DGE o diâmetro dos axônios foi maior que no grupo D ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9** - Diâmetro dos axônios nos grupos: Controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG) e Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE). (\*) Difere do grupo CON ( $p < 0,01$ ); (\*\*) Difere do grupo D ( $p < 0,05$ ).

### 5.4.2 Diâmetro das Fibras

A figura 10 expressa o diâmetro das fibras nervosas, nos diferentes grupos. Observa-se que os valores dos grupos desnervados: D ( $5,80 \pm 0,30$ ), DEG ( $6,06 \pm 0,41$ ) e DGE ( $6,55 \pm 0,76$ ) foram menores que os do grupo CON ( $9,12 \pm 0,33$ ) ( $p < 0,01$ ), não havendo diferença entre os grupos desnervados.

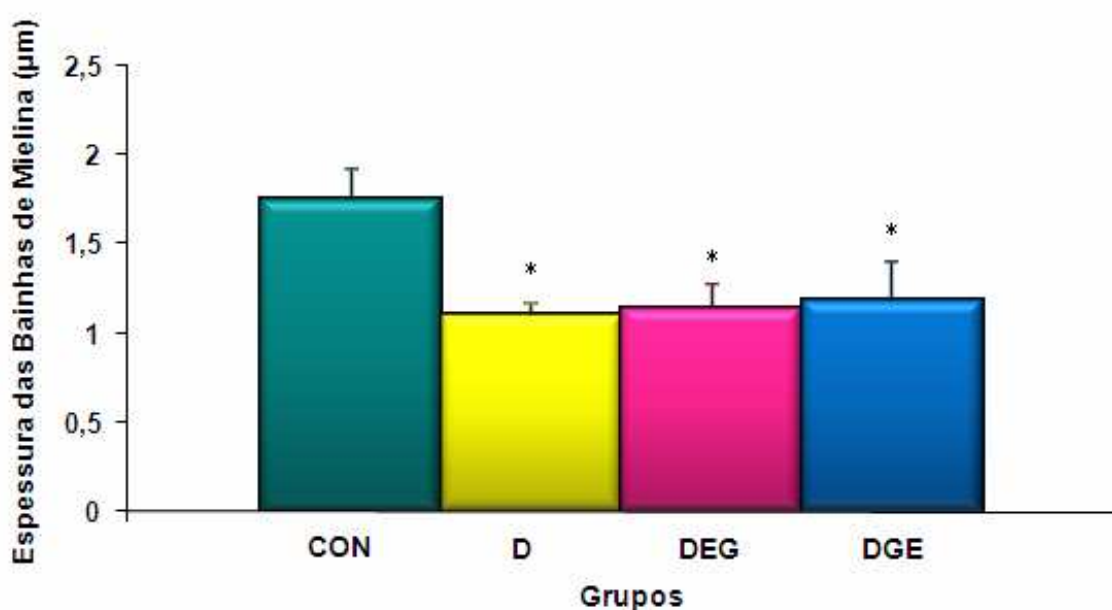


**Figura 10** - Diâmetro das fibras nervosas nos grupos: Controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG) e Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE). (\*) Difere do grupo CON ( $p < 0,01$ ).



### 5.4.3 Espessura das Bainhas de Mielina

A figura 11 representa a espessura das bainhas de mielina, nos diferentes grupos. Observa-se que os valores dos grupos desnervados: D ( $1,10 \pm 0,05$ ), DEG ( $1,14 \pm 0,12$ ) e DGE ( $1,18 \pm 0,20$ ) foram menores que os do grupo CON ( $1,75 \pm 0,16$ ) ( $p < 0,01$ ), não havendo diferença entre os grupos desnervados.



**Figura 11** - Espessura da bainha de mielina nos grupos: Controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG) e Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE). (\*) Difere do grupo CON ( $p < 0,01$ ).

#### 5.4.4 Razão G

A Tabela 1 expressa os valores da razão G. Os resultados foram semelhantes em todos os grupos estudados ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1** - Razão G nos grupos Controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG) e Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE).

| <b>Grupos</b>    | <b>CON</b> | <b>D</b>   | <b>DEG</b> | <b>DGE</b> |
|------------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Média ±DP</b> | 0,61 ±0,02 | 0,62 ±0,01 | 0,62 ±0,01 | 0,64 ±0,01 |

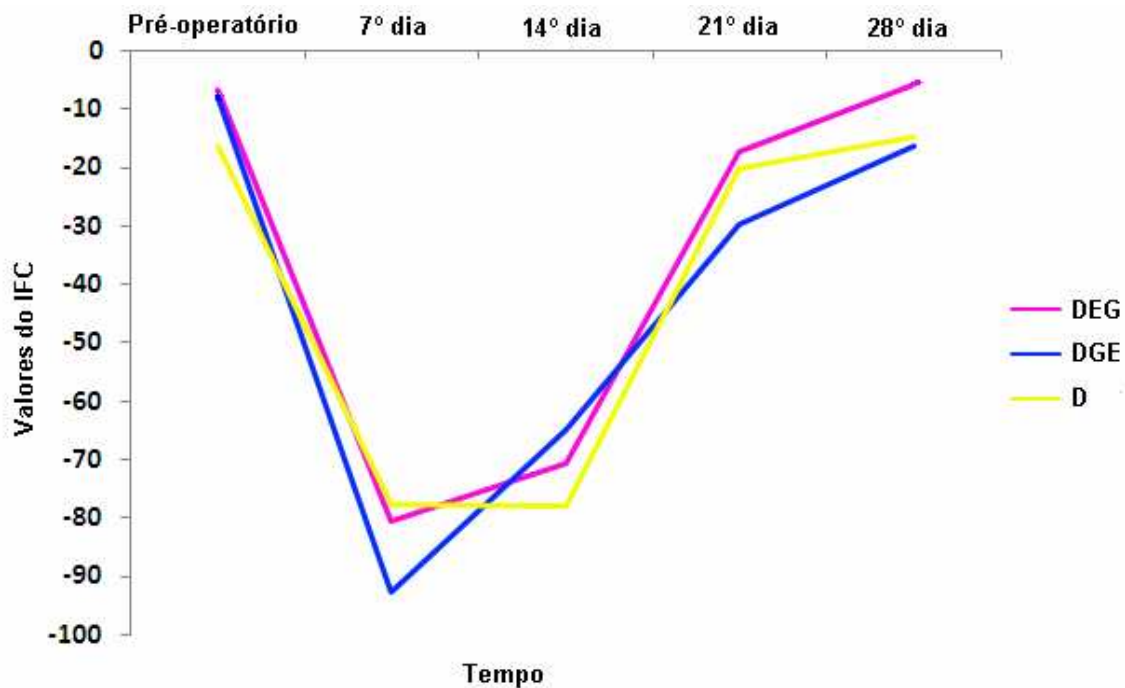
#### 5.5 Análise Funcional da Marcha

Os dados da análise do IFC dos grupos experimentais durante os períodos de avaliação funcional estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Valores do IFC nos diferentes períodos de avaliação funcional.

| <b>Tempo</b>          | <b>D</b>      | <b>DEG</b>    | <b>DGE</b>    |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Pré-operatório</b> | -16,18 ±14,24 | -6,44 ±9,46   | -8,06 ±9,30   |
| <b>7º dia</b>         | -77,62 ±25,17 | -80,62 ±11,61 | -92,84 ±20,94 |
| <b>14º dia</b>        | -78,00 ±13,66 | -70,62 ±7,95  | -64,93 ±24,38 |
| <b>21º dia</b>        | -20,20 ±15,57 | -17,01 ±11,85 | -9,91 ±18,18  |
| <b>28º dia</b>        | -14,66 ±8,70  | -5,60 ±21,21  | -16,47 ±16,25 |

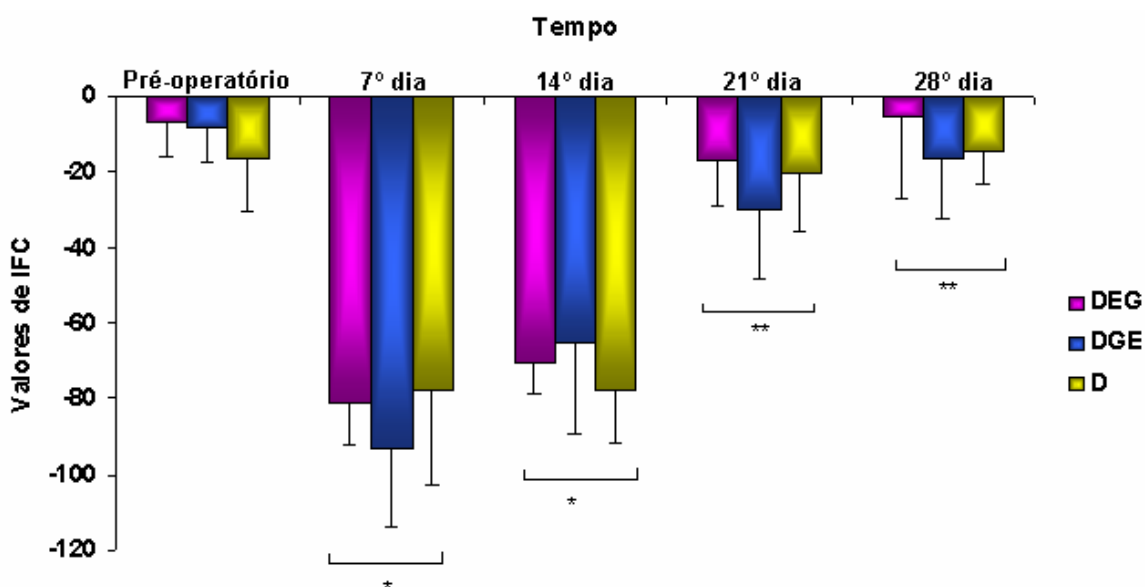
Nas comparações intergrupos dos valores do IFC nos diferentes períodos de avaliação (Figura 12), verifica-se que as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ).



**Figura 12** – Comparação intergrupos dos valores de IFC nos grupos: Desnervado (D), Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG) e Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE), nos diferentes períodos de avaliação.

Nas comparações intragrupos dos valores do IFC nos diferentes períodos de avaliação (Figura 13), verifica-se que as diferenças foram estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).

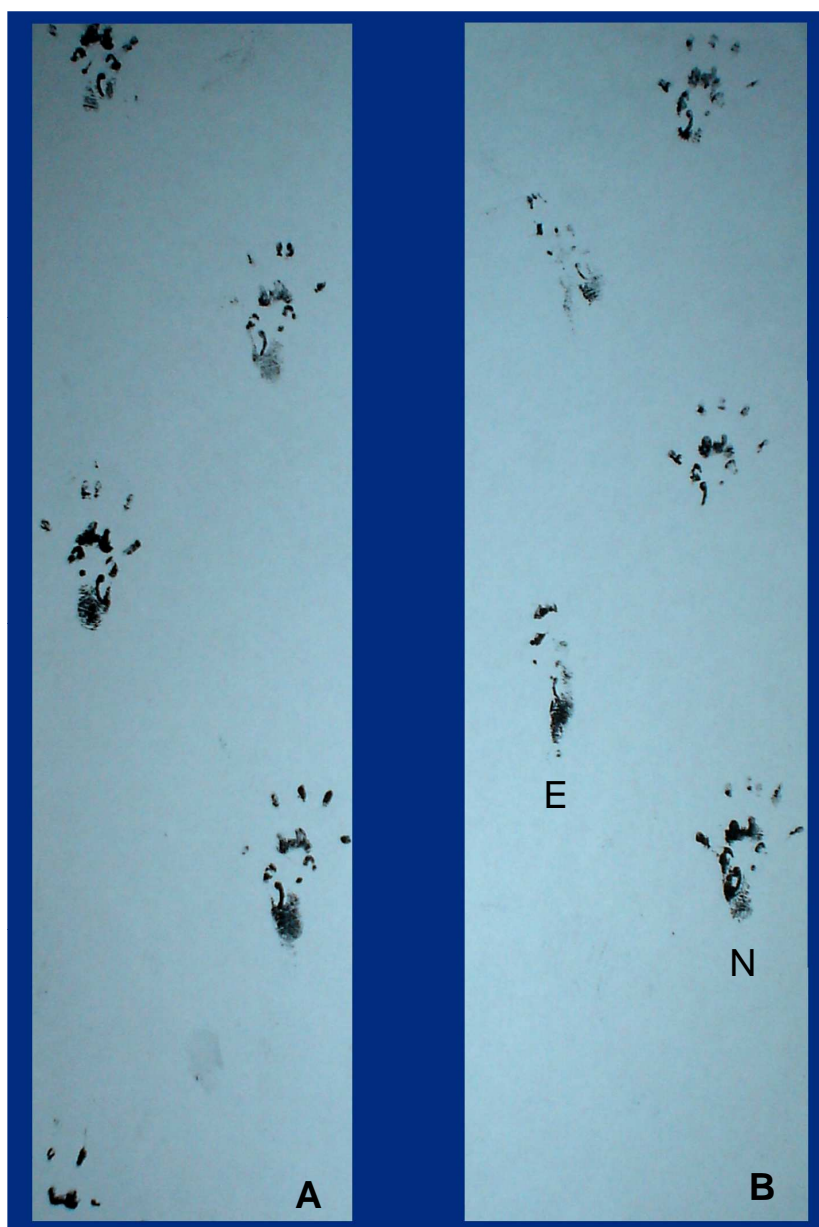
Para todos os grupos experimentais foram observados que o 7º e o 14º dia diferem significativamente do período pré-operatório, enquanto o 21º e o 28º dia diferem significativamente do 7º e do 14º dia durante os períodos de avaliação funcional.



**Figura 13** – Comparação intragrupos dos valores de IFC nos grupos: Desnervado (D), Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG) e Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE), nos diferentes períodos de avaliação. (\*) em relação ao pré-operatório; (\*\*) em relação ao 7º dia e 14º dia ( $p < 0,05$ ).

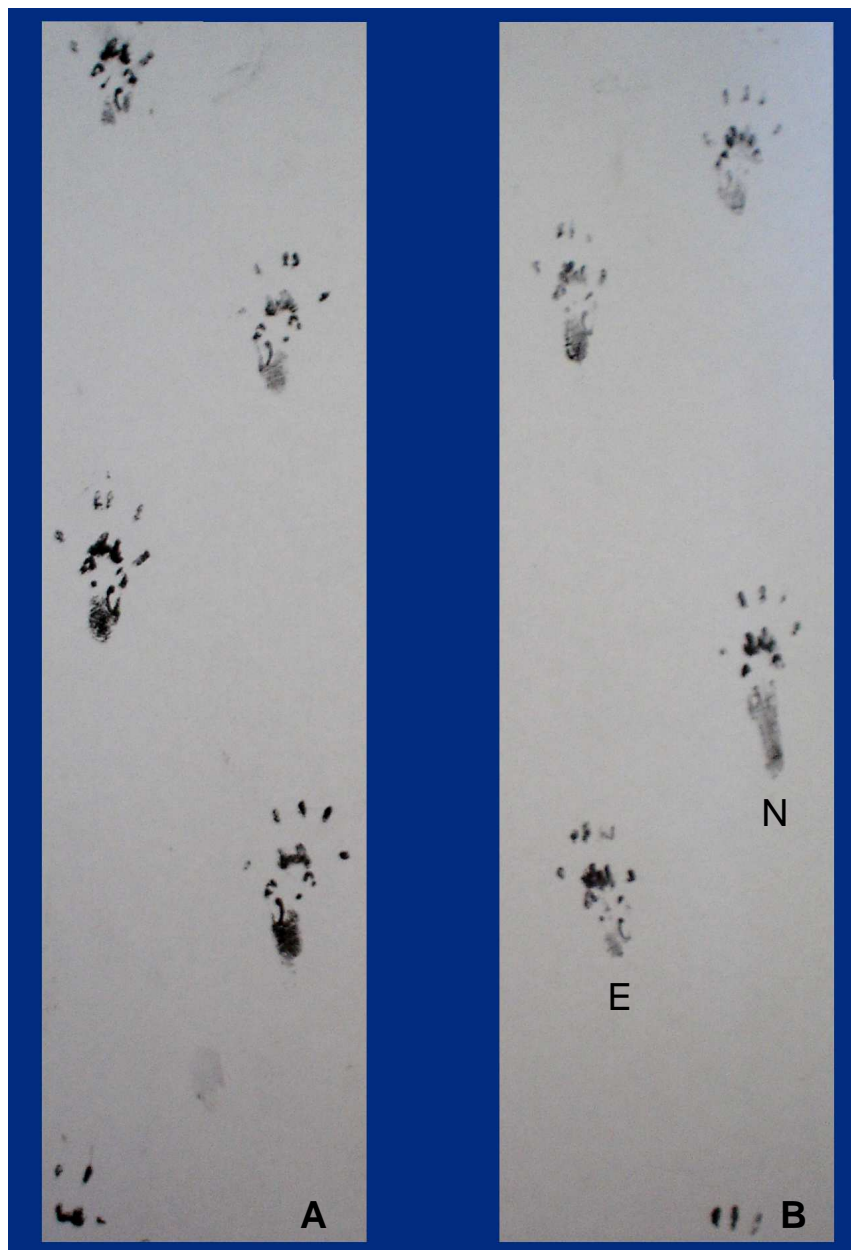
Na análise das pegadas das patas normal (N) e experimental (E), percebe-se uma evolução semelhante em todos os grupos durante os diferentes períodos de avaliação por meio do IFC.

Na comparação dos registros das pegadas no pré-operatório com o 7º dia pós-lesão (Figura 14), verifica-se um aumento do parâmetro PL e uma diminuição dos parâmetros TS e ITS.



**Figura 14** - Registro das pegadas das patas normal e experimental na avaliação do IFC nos períodos pré-operatório (A) e no 7º dia pós-lesão (B).

Na comparação do registro das pegadas no pré-operatório com o 28º dia pós-lesão (Figura 15), percebe-se que as pegadas são semelhantes nos diferentes períodos de avaliação.



**Figura 15** - Registro das pegadas das patas normal e experimental na avaliação do IFC nos períodos pré-operatório (A) e no 28º dia pós-lesão (B).

## 5.6 Correlação entre os Dados Morfométricos e o Índice Funcional do Ciático (IFC)

Na tabela 3 estão expressos os valores de correlação entre os dados morfométricos e funcionais do grupo Desnervado (D).

A correlação entre os valores de diâmetro do axônio e da fibra nervosa mostrou-se forte, com  $r = 0,93$ .

**Tabela 3** - Correlações entre os dados morfométricos e o Índice Funcional do Ciático (IFC) do grupo Desnervado (D).

|                    | Nº. Axônio | Ø Axônio     | Ø Fibra | Esp. Mielina | Razão G | IFC-28º |
|--------------------|------------|--------------|---------|--------------|---------|---------|
| <b>NºAxônios</b>   | 1          |              |         |              |         |         |
| <b>Ø Axônio</b>    | -0,17      | 1            |         |              |         |         |
| <b>Ø Fibra</b>     | -0,36      | <b>0,93*</b> | 1       |              |         |         |
| <b>Esp.Mielina</b> | -0,56      | 0,42         | 0,72    | 1            |         |         |
| <b>Razão G</b>     | -0,30      | -0,63        | 0,31    | -0,44        | 1       |         |
| <b>IFC-28º</b>     | -0,61      | -0,51        | -0,47   | -0,19        | -0,33   | 1       |

Nº = número; Ø = diâmetro; Esp. = espessura; IFC-28º = Índice Funcional do Ciático no 28º dia. \*  $p < 0,05$

Na tabela 4 estão expressos os valores de correlação entre os dados morfométricos e funcionais do grupo Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG).

A correlação entre os valores do diâmetro do axônio e da fibra nervosa ( $r= 0,92$ ), diâmetro da fibra nervosa e espessura da bainha de mielina ( $r=0,96$ ), razão G e espessura da bainha de mielina ( $r=-0,93$ ) mostrou-se forte.

**Tabela 4** - Correlações entre os dados morfométricos e o Índice Funcional do Ciático (IFC) do grupo Desnervado + Exercício + Gaiola (DEG).

|                     | <b>Nº. Axônios</b> | <b>Ø Axônio</b> | <b>Ø Fibra</b> | <b>Esp. Mielina</b> | <b>Razão G</b> | <b>IFC-28º</b> |
|---------------------|--------------------|-----------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|
| <b>Nº. Axônios</b>  | 1                  |                 |                |                     |                |                |
| <b>Ø Axônio</b>     | -0,58              | 1               |                |                     |                |                |
| <b>Ø Fibra</b>      | -0,53              | <b>0,92*</b>    | 1              |                     |                |                |
| <b>Esp. Mielina</b> | -0,44              | 0,76            | <b>0,96*</b>   | 1                   |                |                |
| <b>Razão G</b>      | -0,25              | -0,46           | -0,77          | <b>-0,93*</b>       | 1              |                |
| <b>IFC-28º</b>      | 0,49               | 0,16            | -0,01          | -0,14               | 0,26           | 1              |

Nº = número; Ø = diâmetro; Esp. = espessura; IFC-28º = Índice Funcional do Ciático no pré-operatório 28º dia. \*  $p<0,05$ .



Na tabela 5 estão expressos os valores de correlação entre os dados morfométricos e funcionais do grupo Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE).

A correlação entre os valores do diâmetro do axônio com o diâmetro da fibra nervosa ( $r= 0,99$ ) e com a espessura da bainha de mielina ( $r=0,96$ ); diâmetro da fibra nervosa com a espessura da bainha de mielina ( $r=0,99$ ) e com a razão G ( $r=-0,91$ ), e entre a espessura da bainha de mielina e a razão G ( $r=0,96$ ), mostrou-se forte.

**Tabela 5** - Correlações entre os dados morfométricos e o Índice Funcional do Ciático (IFC) do grupo Desnervado + Gaiola + Exercício (DGE).

|                     | <b>Nº. Axônios</b> | <b>Ø Axônio</b> | <b>Ø Fibra</b> | <b>Esp. Mielina</b> | <b>Razão G</b> | <b>IFC-28º</b> |
|---------------------|--------------------|-----------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|
| <b>Nº. Axônios</b>  | 1                  |                 |                |                     |                |                |
| <b>Ø Axônio</b>     | -0,80              | 1               |                |                     |                |                |
| <b>Ø Fibra</b>      | -0,75              | <b>0,99*</b>    | 1              |                     |                |                |
| <b>Esp. Mielina</b> | -0,70              | <b>0,96*</b>    | <b>0,99*</b>   | 1                   |                |                |
| <b>Razão G</b>      | 0,57               | -0,84           | <b>-0,91*</b>  | <b>-0,96*</b>       | 1              |                |
| <b>IFC-28º</b>      | -0,27              | 0,11            | -0,04          | -0,16               | 0,44           | 1              |

Nº = número; Ø = diâmetro; Esp. = espessura; IFC-28º = Índice Funcional do Ciático no pré-operatório 28º dia. \*  $p<0,05$ .

## **6 DISCUSSÃO**

### **6.1 Considerações Gerais sobre o Material e Métodos**

#### **6.1.1 Animais Experimentais**

Para realização desta pesquisa, o animal adotado foi o rato da linhagem Wistar, uma vez que a maior parte das pesquisas experimentais, quase 90% do total, emprega animais de pequeno porte (camundongo, rato, hamster) (Schanaider e Silva, 2004) por serem animais de baixo custo, de fácil manuseio e disponibilidade, e que apresentam anatomia microscópica semelhante à de nervos humanos (Varejão et al., 2003; 2004; Mazzer et al., 2006; Pachioni et al., 2006). Além disso, o fato de o nervo isquiático ser de fácil acesso cirúrgico favorece a escolha desse animal para pesquisas que analisam as conseqüências da desnervação (Varejão et al., 2004; Seo et al., 2006).

Para padronização da amostra, utilizou-se ratos do gênero masculino com idade entre 6 e 7 semanas. Ratos do gênero feminino foram excluídos do estudo por apresentarem ciclo estral que pode afetar o comportamento motor (alteração da intensidade da ambulação) e, conseqüentemente, influenciar os resultados da pesquisa (Junior e Morato, 2002).

Em relação à idade dos animais, foram utilizados ratos jovens, considerando que a regeneração nervosa declina com o avanço da idade (Verdú et al., 2000).

### 6.1.2 Modelo de Lesão Nervosa

O anestésico utilizado para sedação dos animais (mistura de Ketalar® e Rompum® - i.m.) é indicado para animais de pequeno porte, por mantê-los em plano anestésico durante aproximadamente 40 a 60 minutos, evitando o risco de vida (Schanaider e Silva, 2004). Esse tempo é suficiente para a realização da lesão nervosa experimental.

A lesão do tipo axoniotmese foi escolhida por ser uma modalidade útil e reprodutível para o estudo da regeneração nervosa periférica, onde a agressão ao nervo é suficiente para causar degeneração Walleriana na porção distal e permitir regeneração nervosa, devido à preservação dos envoltórios conjuntivos, da membrana basal e da microcirculação local (Lunn, Brown e Perry, 1990).

Além disso, os resultados obtidos por Bridge et al. (1994), que avaliaram e compararam os efeitos de vários métodos de lesão por esmagamento em ratos, usando fórceps de joalheiro e pinça hemostática com tempos de compressão variando de 15 a 30 segundos, demonstraram a presença de degeneração Walleriana após 2 semanas, em todos os grupos experimentais, não havendo diferença histológica no nervo nos diferentes métodos empregados.

Neste estudo, para investigar a eficácia do protocolo de esmagamento proposto sobre a estrutura do nervo, um estudo piloto foi desenvolvido em nosso laboratório, utilizando cinco animais que foram desnervados e sacrificados após 6 dias, quando o processo de degeneração Walleriana deveria ser evidente. Observou-se intensa degeneração axonal e desintegração da bainha de mielina, o que ratifica a eficiência do protocolo de lesão utilizado.

Entretanto, a reprodutibilidade do protocolo de indução da lesão nervosa utilizado neste estudo é bastante discutida na literatura, uma vez que não existe um método padrão estabelecido para induzir determinada lesão nervosa, considerando que cada pesquisa utiliza uma técnica diferente (Mazzer et al., 2006).

### **6.1.3 Protocolo de Exercício**

A literatura é escassa no que se refere à discussão dos efeitos do exercício físico na fase imediata da lesão nervosa (Seo et al., 2006). Desta forma, este estudo pode contribuir para subsidiar discussões sobre a conduta empregada na clínica fisioterapêutica.

A atividade física promove várias alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas no homem e no animal (Gutmann e Jakoubeck, 1963; Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; 1980a; 1980b; Hie, Van Nie, Vermculen-Van der Zee, 1982; Van Meeteren et al., 1997; Byun et al., 2005), além de induzir alterações permanentes, tanto no sistema nervoso central como no periférico (Seo et al., 2006). Nesse sentido, o exercício na esteira é um recurso utilizado para estudar a regeneração axonal (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1980; Hie, Van Nie e Vermculen-Van der Zee, 1982; Van Meeteren et al., 1997; Byun et al., 2005), por ser possível controlar devidamente seus parâmetros (Seo et al., 2006).

Realizou-se uma seleção dos ratos mais aptos para participar do estudo, sendo escolhidos aqueles que correram de cinco a dez minutos em velocidade de 17 m/min, com inclinação de 0%, durante uma semana, considerando que o rato não nasce com habilidade de correr, como ocorre com a

de nadar (Pills et al., 1993; Gobatto et al., 2001; Machado et al., 2005). A opção pela velocidade de 17 m/min, deveu-se ao fato de que tal velocidade é a de equilíbrio entre a produção e remoção do lactato para ratos normais em esteira ergométrica (Pills et al., 1993).

A breve adaptação à esteira teve por objetivo familiarizar os animais ao futuro protocolo de exercício, reduzindo o estresse, contudo, sem promover adaptações físicas (Jaweed, Herbison e Ditunno, 1975; Herbison, Jaweed e Ditunno, 1982).

Neste estudo utilizou-se o exercício na esteira durante 30 minutos/dia, na velocidade de 8 m/min e inclinação de 0%, por se tratar de animais desnervados e com base nos resultados de Byun et al. (2005), em que essa intensidade permitiu efetiva recuperação funcional após a desnervação. A frequência de estimulação de cinco vezes por semana foi baseada no estudo de Sakakima et al. (2004), que aplicaram exercício físico na esteira de três a seis vezes por semana e observaram benefícios ao trofismo muscular.

A afirmação de Seo et al. (2006) de que os valores baixos de velocidade e inclinação de 0% proporcionam regeneração axonal em animais desnervados também serviu de fundamentação para este estudo. No entanto, a intensidade utilizada no presente estudo não está fundamentada no limiar de anaerobiose, uma vez que não existem dados na literatura para ratos desnervados.

A escolha do tempo para análise morfométrica e funcional do nervo isquiático após lesão se fundamentou nos achados de Carmignoto et al. (1983) e Gorio et al. (1983), que estudaram o processo de reinervação muscular após axoniotmese em ratos e observaram que após 10 dias da lesão, nenhum axônio

havia estabelecido contato com o músculo, o que ocorria a partir da segunda semana da lesão, quando se observou que 25% das fibras musculares estavam re-inervadas por mais de um axônio (poliinervação). Entre 21<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dias ocorreu o “pico” de poliinervação, que foi seguida pelo processo de eliminação dos contatos sinápticos (eliminação sináptica). Aos 60 dias da lesão, as fibras estavam monoinervadas e, a partir daí, o nervo mantinha o crescimento e ocupava completamente a fenda pós-sináptica no 90<sup>o</sup> dia. Assim, considerando que a partir do 14<sup>o</sup> dia após a axoniotmese os axônios regenerados estariam recuperando seus contatos com as fibras musculares, optou-se por verificar se o exercício aplicado previamente a esse momento (na fase imediata de regeneração) ou após este período (fase tardia de regeneração) poderia modificar a evolução desse processo.

Quanto ao início de atividade física, houve um grupo que realizou exercício na fase de desnervação (imediata) e outro na fase de reinervação (tardia), uma vez que os efeitos do exercício variam de acordo com o momento de sua realização. De acordo com a literatura, os resultados podem ser benéficos, havendo aumento do retorno da função sensório-motora na fase inicial da recuperação da lesão quando o exercício é realizado na fase precoce (Van Meeteren et al., 1997); deletérios, havendo inibição do brotamento axonal quando a atividade física é realizada imediatamente após a desnervação do músculo tibial anterior (Tam et al, 2001; Tam e Gordon, 2003); ou indiferentes, não havendo interferência sobre a reinervação muscular quando o exercício é realizado na fase tardia (Hie, Van Nie e Vermculen-Van der Zee, 1982).

Os estudos realizados por Herbison, Jaweed e Ditunno (1982) e Van Meeteren et al. (1997), que avaliaram os efeitos do exercício aplicado 2 semanas

e 24 horas após a axoniotmese, respectivamente, fundamentam os períodos de análise escolhidos para esta pesquisa.

#### **6.1.4 Regeneração axonal e Análise morfométrica**

Diversos estudos experimentais mostram que o exercício físico tem ação estimulante para a regeneração nervosa (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974; 1980a; 1980b; Hie, Van Nie, Vermculen-Van der Zee, 1982; Van Meteeren et al., 1997; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006). No entanto, ainda não há consenso sobre o melhor momento para iniciar a prática dessa atividade após axoniotmese.

A hipótese para este estudo era que o exercício praticado a partir de 24 horas da lesão nervosa inibisse a regeneração nervosa, pois o aumento da atividade neuromuscular inibe a liberação de fatores neurotróficos, como a molécula de adesão celular neural (NCAM), necessária para que ocorra a regeneração (Tam et al, 2001; Lieber, 2002; Tam e Gordon, 2003).

Entretanto, observou-se que a realização do exercício, tanto na fase imediata quanto tardia, não influenciou o brotamento axonal, fato que se evidencia pela semelhança no número de axônios regenerados nos três grupos desnervados, onde o número de axônios praticamente duplicou após 30 dias da lesão. Esse aumento do número de axônios na porção distal à lesão se deve ao fato de que cada axônio lesado emite dois ou três brotos em direção ao músculo, sendo que o primeiro a fazer contato com a fibra muscular permanece, enquanto os demais sofrem degeneração (Fawcett e Keynes, 1990).

Sob a ótica da prática clínica, esse resultado sugere que a indução do exercício físico após desnervação, com objetivo de retardar as alterações tróficas no músculo, poderia não prejudicar o processo de regeneração nervosa.

Entretanto, há relatos de que o aumento da atividade neuromuscular provocado pelo exercício de corrida na roda durante 8 horas diárias, na fase aguda da lesão, inibe o brotamento axonal no músculo desnervado (Tam et al. 2001; Tam e Gordon, 2003). É possível que o prejuízo à reinervação se deva ao tempo do exercício realizado.

No que se refere à maturação das fibras regeneradas, Verdú et al. (2000) afirmam que esta dificilmente atinge valores semelhantes aos do controle após a lesão nervosa. Os autores relataram que o diâmetro da fibra atinge 75% dos valores controle após a lesão.

Neste estudo, o diâmetro da fibra do grupo D atingiu 63,59% dos valores controle, enquanto no grupo DGE esse valor atingiu 71,82% e no grupo DEG, 66,44%. Entretanto, vale ressaltar que essa análise foi obtida após 33 dias da lesão. Uma análise após períodos mais prolongados poderia expressar valores mais próximos aos relatados na literatura.

O diâmetro médio das fibras em nervo normal varia entre 8 (Calder e Green, 1995) e 12,45  $\mu\text{m}$  (Teodori, 2000) sendo que para os axônios esse valor varia entre 4,52 (Lenihan et al, 1998) e 7,83  $\mu\text{m}$  (Teodori, 2000). Para a espessura das bainhas de mielina, os valores médios variam entre 1,11 (Santo Neto et al., 2004) e 1,94 (Souza, 2005).

Nos grupos desnervados, a atividade física em esteira na fase imediata ou tardia da lesão não influenciou o grau de maturação das fibras regeneradas após 33 dias da lesão, uma vez que apenas o diâmetro de axônio do grupo DGE



foi maior que do grupo D, enquanto os demais parâmetros analisados não diferiram entre os grupos desnervados.

A ausência de dados morfométricos referentes a nervos de ratos desnervados submetidos a exercício em esteira, em qualquer fase da regeneração nervosa após axoniotmese, impossibilitou a confrontação dos resultados obtidos neste estudo. Uma vez que a regeneração nervosa influencia a resposta muscular, discute-se a seguir alguns efeitos do exercício físico no músculo desnervado, tanto na fase imediata como na tardia.

Deschenes, Maresh e Kraemer (1997) citam que a prática de exercício na esteira com um grupo de animais sedentários e outro de animais exercitados (velocidade de 24 m/min e inclinação de 0%) durante cinco dias/semana por um mês e meio na fase tardia, não foi suficiente para alterar os efeitos da desnervação sobre o músculo, não havendo diferença significativa no tipo e no tamanho da fibra muscular entre os grupos. Concluíram que o exercício de moderada intensidade com esses parâmetros da esteira não influencia a morfologia muscular no animal desnervado.

Herbison, Jaweed e Ditunno (1974, 1980a, 1980b) e Hie, Van Nie e Vermculen-Van der Zee (1982) afirmaram que a pausa de duas semanas na gaiola após a lesão nervosa é necessária para realizar o exercício físico de forma segura, uma vez que antes desse período (fase de desnervação) não há uma quantidade suficiente de unidades contráteis para serem recrutadas, o que pode gerar danos musculares, pois o processo de reinervação começa entre a segunda e a terceira semana. Além disso, a alta intensidade do exercício durante o processo da desnervação gera lesão muscular por ocasionar estresse no animal.

Contrariamente, Marqueste et al. (2004), afirmaram que o protocolo de exercício na esteira com velocidade de 10 m/min e inclinação de 0% após uma semana da secção do nervo fibular, proporciona aumento da resistência à fadiga, recuperação das propriedades contráteis e da mecanosensibilidade do músculo, devido a combinação de baixos parâmetros da esteira com início precoce do exercício.

Ao analisar esses relatos, pode-se considerar que os efeitos gerados pela atividade física após lesão nervosa periférica dependem do momento do início da atividade física, bem como dos parâmetros da esteira, havendo ainda controvérsia entre os diferentes estudos.

Os valores de razão G, semelhantes em todos os grupos, estão dentro dos padrões de normalidade para uma velocidade de condução nervosa ideal, ou seja, entre 0,5 e 0,7 (Waxmann e Bennet, 1972; Ansellin, Fink e Davey, 1997), reforçando o fato de que a prática de exercício em esteira, tanto na fase imediata como tardia, não prejudicou a maturação dos axônios regenerados. Valores G acima ou abaixo dessa faixa de normalidade representam hipomielinização ou hipermyelinização, respectivamente (Ansellin, Fink e Davey, 1997).

Os valores de razão G observados neste estudo são semelhantes aos encontrados por Santo Neto et al. (2004), que observaram 0,63 para o controle, 0,73 para o grupo onde o nervo isquiático foi lesado e um implante de músculo tibial anterior tratado com cloridrato de lidocaína 2% foi suturado entre os cotos após 15 minutos e 0,72 quando um enxerto muscular tratado da mesma forma foi implantado após 24 horas.

Mazzer et al. (2006), que relataram 0,53 para o controle e 0,42 para os animais submetidos à compressão do nervo isquiático com carga de 500 gramas.

Wolthers et al. (2005) obtiveram valor de razão G de 0,49 para o controle e 0,54 para os animais desnervados após axoniotmese.

Ao considerar os benefícios do exercício físico para o animal desnervado, como o aumento do número e do diâmetro dos axônios (Gutmann e Jakoubeck, 1963), elevação do peso e da força muscular (Hie, Van Nie e Vermculen-Van der Zee, 1982), aumento da capacidade oxidativa do músculo (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1982), rápido retorno da função sensório-motora na fase inicial e tardia, acelerando a recuperação funcional (Van Meeteren et al., 1997), aumento da mielinização das fibras (Seo et al., 2006), entre outros, reafirma-se a importância de investigar e discutir a prática clínica, uma vez que a indução de atividade neuromuscular (a partir do protocolo de exercício empregado) em músculos desnervados não prejudicou o processo de regeneração axonal. Desta forma, seus benefícios ao músculo poderiam sustentar sua aplicabilidade, especialmente no sentido de retardar atrofia, o que poderia refletir diretamente em recuperação funcional mais efetiva após a regeneração nervosa.

O protocolo de exercício em esteira aplicado neste estudo, na fase imediata ou tardia da regeneração nervosa, não influenciou o brotamento axonal nem a maturação das fibras regeneradas. Considerando que a desnervação provoca profundas alterações no músculo (Deschenes, Maresh e Kraemer, 1997), é razoável a afirmação de Van Meeteren et al. (1997), Byun et al. (2005) e Seo et al. (2006), de que a realização do exercício físico na fase imediata após a lesão nervosa é a melhor opção.

Entretanto, ao considerar a possibilidade de ampla variação dos parâmetros empregados, como velocidade e inclinação da esteira, além da

duração e freqüência do exercício, novos estudos são necessários para investigar as respostas do sistema nervoso periférico e associá-las à condição clínica.

### **6.1.5 Correlação entre os Resultados Morfométricos e Funcionais**

A eletrofisiologia, a histomorfometria e os testes funcionais têm sido bastante utilizados para quantificar a regeneração nervosa em estudos experimentais. Assim, vários autores analisam a correlação entre essas mensurações (Kanaya, Firrell e Breidenbach, 1996; Munro et al., 1998; Wolthers et al., 2005).

A correlação entre os aspectos morfológicos e funcionais de nervos regenerados representa importância clínica, pois possibilita a análise de resultados de diferentes formas de intervenção que podem favorecer a regeneração nervosa e, conseqüentemente, a recuperação funcional. Entretanto, no presente estudo não foi possível evidenciar clara correlação entre os dados morfométricos e a recuperação funcional, avaliada por meio do IFC.

A ausência de correlação entre os resultados fisiológicos, morfológicos e funcionais pode ser devida ao fato de que cada avaliação mensura aspectos diferentes da regeneração nervosa (Kanaya, Firrell e Breidenbach, 1996; Munro et al. 1998). Além disso, Kanaya, Firrell e Breidenbach (1996) citaram três hipóteses para essa pobre correlação: (1) o IFC mensura a função total do nervo; (2) as demais mensurações consideram vários parâmetros (como diâmetro do axônio, diâmetro da fibra, espessura da bainha de mielina, entre outras), não sendo possível relacionar com apenas um parâmetro do IFC; (3) a avaliação de um

único parâmetro não é suficiente para mensurar a função total do nervo. Desta forma, é importante a associação de diversos parâmetros.

Assim, um baixo grau de recuperação funcional não indica o mesmo resultado na análise morfométrica e histológica quando se correlaciona diferentes componentes de mensuração. Por outro lado, Varejão et al. (2001) apontam moderada correlação entre os três parâmetros comumente utilizados para avaliar regeneração nervosa em ratos após axoniotmese.

Dellon e Mackinnon (1989) demonstraram significativa correlação entre os parâmetros eletrofisiológicos e morfométricos, no entanto, apontam não haver correlação entre os parâmetros fisiológicos e os testes funcionais, como o Índice Funcional do Ciático (IFC).

Contrariamente, Oliveira et al. (2001) afirmam que há uma clara correlação entre os dados morfométricos e a recuperação funcional, medida pelo Índice Funcional do Ciático (IFC), onde perceberam uma melhora da recuperação funcional acompanhada do aumento do número e da qualidade de fibras regeneradas.

Para Munro et al. (1998), a significativa correlação entre a função e as demais mensurações da regeneração nervosa encontrada em alguns estudos se deve a amostras pequenas ou à utilização de animais com nervos completamente normais ou completamente danificados, sem prognóstico de recuperação.

Kobayashi et al. (1997) relataram que a recuperação funcional não apresenta uma relação diretamente proporcional ao tempo em que o músculo permaneceu desnervado, uma vez que as mudanças morfológicas no músculo são intensas imediatamente após a lesão e mais discretas a partir do primeiro

mês, afetando a massa corporal e a recuperação funcional de ratos que tiveram o nervo tibial anterior seccionado e reparado cirurgicamente em diferentes períodos.

Neste estudo, onde o grupo DGE iniciou o exercício quando já apresentava alteração do trofismo muscular e o DEG iniciou antes de desenvolver tais modificações, não foi realizada análise morfométrica do músculo reinervado. Entretanto, o momento de início do exercício físico não influenciou a regeneração axonal, nem os valores do IFC.

#### **6.1.6 Análise Funcional da Marcha**

O IFC apresenta algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais de avaliação da regeneração nervosa periférica, como a eletrofisiologia, a histologia e a morfometria, pois além de não ser invasivo e ser facilmente reproduzível, apresenta baixo custo e confiabilidade para avaliar o processo de regeneração (Varejão et al., 2004), integra o sistema sensorial e o motor (Kanaya, Firrell e Breidenbach, 1996), o que o torna fidedigno (Varejão et al., 2001).

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

Entretanto, por mais fidedigno que seja o método de avaliação, alguns fatores, como a presença de autotomia, contratura em flexão, entre outros, podem limitar a coleta da impressão da pata normal e experimental em papel sulfite ou papel fotográfico (Dijkstra et al., 2000; Varejão et al., 2001; 2004).

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

Neste estudo não se observou contratura em flexão, provavelmente devido à mobilização constante do membro desnervado durante o exercício, o que pode influenciar positivamente a fase de regeneração (Van Meeteren et al., 1997) e ao tipo de lesão nervosa – axionotmese – onde a regeneração é espontânea e a reinervação do músculo ocorre em curto período de tempo. Também não se observou autotomia, pois esta é mais comum na neurotmeese (Varejão et al., 2001) que na axionotmese. A ausência de autotomia também pode ser devida à recuperação funcional bem sucedida (Dijkstra et al., 2000), conforme observado neste estudo.

Quando se comparou a modificação nas pegadas dos animais desnervados no pré-operatório e no 7º dia, os resultados foram semelhantes aos relatados por Bain, Mackinnon e Hunter (1989), que demonstraram aumento do parâmetro PL e da dorsiflexão e diminuição dos parâmetros IT e ITS, característicos após desnervação. Esse resultado reafirma a eficácia do protocolo de esmagamento do nervo realizado neste estudo.

Ao comparar os resultados do IFC entre os grupos desnervados, observa-se que o exercício em esteira aplicado na fase imediata ou tardia da regeneração nervosa após axionotmese não influenciou o grau de recuperação funcional. Reporta-se novamente aqui à importância da estimulação precoce de músculos desnervados, pois além de não prejudicar a regeneração nervosa e a recuperação funcional, conforme observado neste estudo, atua no sentido de

evitar a atrofia pós-desnervação (Marqueste et al., 2004; Tanaka, Tsubaki e Tachno, 2005), o que pode favorecer ainda mais a recuperação da função após regeneração nervosa.

No entanto, Byun et al., (2005) apontaram o exercício em esteira, realizado na fase precoce da regeneração, como fator efetivo na recuperação funcional (valores do IFC perto do zero) após esmagamento do nervo isquiático em ratos. Provavelmente esse resultado seja devido ao momento de início da atividade (72 horas após a lesão), uma vez que os parâmetros da esteira foram semelhantes aos do presente estudo. Dados semelhantes foram encontrados por Seo et al. (2006), que obtiveram resultados funcionais positivos, avaliados por meio do IFC, ao realizar exercício em esteira na fase de desnervação (12 horas após a lesão) com velocidade de 18 m/min e 0% de inclinação.

Ao considerar esses relatos, nota-se a importância dos parâmetros empregados na atividade física, como velocidade e inclinação da esteira, assim como a duração e frequência do exercício, como fatores relevantes para alterar as respostas do sistema nervoso periférico.

Numa comparação intragrupos dos valores do IFC, observou-se diferença significativa entre os tempos de análise. Esses dados estão de acordo com diversos pesquisadores que afirmam haver boa recuperação funcional no decorrer das avaliações após esmagamento do nervo isquiático de ratos (Varejão et al., 2001; 2003; 2004; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006).

Os valores de IFC perto de -100 no 7º dia após a lesão demonstram as consequências da desnervação, com perda completa de função. A partir do 14º dia, houve diminuição dos valores de IFC, o que coincide com o período em que inicia a reinervação muscular, quando 25% das junções neuromusculares estão



reinervadas (poliinervadas). Entre o 21<sup>o</sup> e o 25<sup>o</sup> dia, ocorre o pico de poliinervação (Gorio et al., 1983), evidenciado por valores de IFC próximos de zero, caracterizando recuperação funcional. Do 21<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia a regeneração prossegue, porém em ritmo mais lento até iniciar a eliminação sináptica e consequente monoinervação (atingida aos 60 dias).

Hare et al. (1992) também observaram valores médios do IFC de ratos perto de zero (função normal), a partir da segunda semana após esmagamento do nervo isquiático.

Com base no estudo de Dash et al. (1996), que citam o valor médio de 0 a -20% para referir função normal no IFC, pode-se afirmar que os valores médios obtidos no 28<sup>o</sup> dia em todos os grupos experimentais neste estudo refletem condição funcional compatível com a de nervos normais.

Os resultados obtidos da avaliação do IFC indicam que a funcionalidade do membro posterior de ratos após esmagamento do nervo isquiático é alcançada, independentemente da realização do exercício na esteira e da fase em que este é iniciado.

No entanto, apesar do IFC ser um método bem estabelecido e fundamentado na literatura, Kanaya, Firrell e Breidenbach (1996) relatam que apenas um teste não é suficiente para determinar a função de ratos desnervados, mas sim uma combinação de vários testes. Desta forma, a confrontação do teste funcional com os testes morfológico e morfométrico fornece subsídios consistentes para sustentar a conclusão que emerge deste estudo.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos dados encontrados neste estudo, conclui-se que:

- O protocolo utilizado para aplicação de exercício em esteira, tanto na fase imediata como tardia da regeneração nervosa após esmagamento do nervo isquiático de ratos, não influenciou o brotamento axonal, o grau de maturação das fibras regeneradas, nem a funcionalidade dos músculos re-inervados.
- Os resultados do IFC apontam que não houve prejuízo à reinervação do músculo após aplicação do protocolo de exercício, independente do momento de início da atividade física. Este fato sugere que na clínica fisioterapêutica, a realização de exercício em esteira imediatamente após a lesão nervosa periférica não prejudica a recuperação funcional.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados deste estudo, deve-se ressaltar que o grupo de pesquisa pretende dar continuidade às investigações, analisando os efeitos do exercício em esteira, aplicado tanto na fase imediata como tardia sobre o perfil morfométrico do músculo sóleo. Esses dados poderiam sinalizar se o protocolo de exercício aplicado neste estudo teria evitado ou atrasado a atrofia pós-desnervação, como observado na literatura. Além disso, o grupo também tem interesse de analisar se a realização deste inibiu ou não a liberação de fatores neurotróficos, como a NCAM.

Outro aspecto que necessita ser estudado é a ampla variação dos parâmetros empregados, como: a inclinação e a velocidade da esteira, a variação do momento de início da atividade, da frequência e da duração da atividade, uma vez que os parâmetros utilizados neste estudo não influenciaram a maturação de nervos regenerados, a reinervação muscular e a funcionalidade dos músculos reinervados. É possível que a variação de um desses parâmetros possa gerar outros efeitos que necessitam ser avaliados.

**REFERÊNCIAS \***

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

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

Bishop B. Part 3. Responses to lesions in the peripheral nervous system. *Phys Ther.* 1982; 62 (9): 1275-82.

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

Brushart TM. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J Neurosci.* 1993; 13 (6): 2730-38.

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

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

Calder JS, Green CJ Nerve-muscle sandwich grafts: the importance of Schwann cells in peripheral nerve regeneration through muscle basal lamina conduits. *J Hand Surg [Br].* 1995; 20(4):423-8

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

Carter AJ, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after nerve injury and repair. A quantitative and qualitative study. *J Hand Surg.* 1998; 3B (3): 365-69.

---

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

Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowski TG, Ruderman NB et al. Alterations in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinology*. 1992; 131(4): 1821-5. Apud Forti F, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. *Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.* 2004; 18(3): 273-81.

Crockett JL, Edgerton VR. Exercise and restricted activity effects on reinnervated and cross innervated skeletal muscle. *J. Neurol. Sci.* 1975, 25: 1-9.

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.

Dellon AL, Mackinnon SE. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg*. 1989 Sep; 23(3):197-202.

Dennis RG, Dow DE, Faulkner JA. An implantable device for stimulation of denervated muscles in rats. *Med Eng & Physics*. 2003; 25 (3): 239-53.

De Medinacelli 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: 6634-43.

Deschenes MR, Maresh CM, Kraemer WJ. Exercise training of moderate intensity does not abate the effects of denervation on muscle morphology. *Int J Sports Med*. 1997; 18: 426-30.

Devor, M. Schonfeld D, Seltzer Z, Wall PD. Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J Comp Neurol*. 1979; 185 (1): 211-220.

Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen 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.

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.

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 Freqüência. Rev Bras Fisioter. 2005; 9 (2): 235-41

Ferreira R, Neuparth MJ, Ascensão A, Magalhães J, Duarte J, Amado F. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. Revista Portuguesa de ciência do Desporto. 2004; 4(3): 94-111.

Ferreira AS. Lesões nervosas periféricas: Diagnóstico e Tratamento. 2ª edição. São Paulo: Santos, 2006.

Friede RL, Bruck W. Macrophage functional properties during myelin degradation. Adv Neurol. 1993; 59: 327-36.

Forti F, Cancellero KM, Guirro RRJ, Silva CA. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. Rev Bras Educ Fís Esp. 2004; 18(3): 273-81.

Fugleholm K, Schmalbruch H, Krarup C. Post reinnervation maturation of myelinated nerve fibers in the cat tibial nerve: chronic electrophysiological and morphometric studies. J Peripher Nerv Syst. 2000; 5 (2):82-95.

Gallo JR, Maciel BC, Marin-Neto JA, Martins LEB, Lima-Filho EC, Golfetti R, et al. Control of heart rate during exercise in health and disease. Braz J Med Biol Res. 1995; 28 (11-12): 1179-84.

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

Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after nerve injuries. J Peripher Nerv Syst, [S.L]. 2003; 8(4): 236-50.

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

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

Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP et al. Walking track analysis: a long term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 89 (2): 251-8.

Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF, Scott CM. Effect of overwork during reinnervation of rat muscle. *Arch Phys Med Rehabil.* 1973a; 41: 1-14.

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

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

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

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

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.

Hie HB, Van Nie CJ, Vermculen-Van der Zee E. Effect of endurance exercise on fibre type composition and muscle weight of reinnervating rat plantaris muscle. *Pflugers Arch.* 1987; 408: 333-7.

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

Irintchev A, Draguhn A, Werning A. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation. *Neuroscience.* 1990; 39 (1): 231-43.

Irintchev A, Carmody J, Werning A. Effects on recovery of soleus and extensor digitorum longus muscles of prolonged wheel running during a period of repeated nerve damage. *Neuroscience*. 1991; 44 (2): 515-9.

Jaweed MM, Herbison GJ, Ditunno JF. Denervation and reinnervation of fast and slow muscles, a histochemical study in rat. *J Histochem Cytochem*. 1975; 23 (11): 808-27.

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

Junior AG, Morato S. Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. *Interação em Psicologia*. 2002; 6 (2):141-48.

Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration *Plast Reconstr Surg*. 1996; 98(7):1264-71, discussion 1272-4.

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

Kefalides NA, Alper R, Clark CC. Biochemistry and metabolism of basement membranes. *Int Rev Cytol* 1979; 61: 167-228. Apud Teodori MJ. Regeneração axonal através de autotransplante de retalho músculo esquelético obtido a partir de injeção de anestésico. [Dissertação]. São Paulo: UNICAMP; 1996.

Keynes RJ, Hopkins WG, Huang LH. Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle: guidance by residual muscle fiber basement membrane. *Brain Res*. 1984 Mar 19;295(2):275-81.

Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, Kuzon WM Jr. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve*. 1997; 20(7):858-66.

Langfort J, Zarzeczy R, Pilis W, Kaciuba-Uscilko H, Nazar K, Porta S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1996; 114 (1): 51-55.



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

Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation*. 2 ed. Philadelphia Lippincott, USA; 2002.

Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to nerve injury, *Int Rev Neurobiol*. 1971; 14: 49-124.

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

Ludy-Ekman L. *Neurociência: Fundamentos para a reabilitação*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A; 2000.

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

Machado ABM. *Neuroanatomia Funcional*. São Paulo: Atheneu, 1993.

Machado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MAR. Maximal lactate steady state in running rats. *Journal of Exercise Physiology [periódico na Internet]*. 2005 [acesso 2007 Jul 02]; 8 (9): 29-35. Disponível em: <http://www.unm.edu/~rrobergs/JEPonline/Oct05/ManchadoV2.doc>

Maki Y. Specificity in peripheral nerve regeneration: a discussion of the issues and the research. *J Orthopedic Sci*. 2002; 7 (5): 594-600.

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.

Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortop Bras*. 2006; 14(4): 220-225.

Mira JC. Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regenerating fibres after repeated localized freezing, *J Anat.* 1979; 129 (Pt 1): 77-93.

Montgomery D. O papel do lactato em exercício e performance esportiva. *Rev Bras Ciên e Mov.* 1990; 4: 32-50.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev Bras Fisioter.* 2006; 10 (1): 113-119.

Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1998; 21(8):1095-7.

Oldfors A, Johansson BR. Barriers and transport properties of the perineurium. An ultrastructural study with <sup>125</sup>I-labeled albumin and horseradish peroxidase in normal and protein-deprived rats. *Acta Neuropathol (Berl).* 1979; 47 (2): 139-43.

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

Omura T, Sano M, Omura K, Hasegawa T, Doi M, Sawada T. 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, et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo as vascularização. *Acta Ortop Bras.* 2006; 14 (4): 203-7.

Perry VH, Brown MC, Andersson PB. Macrophage responses to central and peripheral nerve injury. *Adv Neurol.* 1993; 59: 309-314.

Pills W, Zarzeczny R, Langfort J, Kaciuba-Uscieko H, Nazar K, Wojtyna J. Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol.* 1993; 106 (2): 285-289.

Polacow MLO, 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 Fisioter.* 2003; 7 (1): 77-84.

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

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

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 (3): 186-192.

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): 188-193.

Schanaider A, Silva PC. Uso do animal em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras.* 2004; 19 (4): 441-7.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943; 66:237-88. Apud Burnet MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus.* 2004; 16 (5): 1-7.

Selli MF. Desenvolvimento de um método computadorizado para avaliação funcional das lesões dos nervos periféricos através da análise da marcha: modelo experimental em rato [Dissertação]. Ribeirão Preto: USP; 1998. Apud 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.

Seo TB, Han IS, Yoon JH, Hong KE, Yoon SJ, Namgung U. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38(7):1267-1276.

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 Fisioter.* 1999; 3 (2): 55-60.

Souza AVA. Efeito da eletroestimulação muscular de baixa frequência sobre a regeneração do nervo isquiático de ratos submetidos a axoniotmese. [Dissertação]. Piracicaba: UNIMEP; 2005.

Sunderland S. The connective tissues of peripheral nerves. *Brain*. 1965; 88 (4): 841-854.

Sunderland S. Nerve and nerve injuries. 2 ed. London: Churehill Livingston; 1978. Apud Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16 (5): 1-7.

Stoll G, Muller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*. 1999; 9 (2): 313-25.

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

Tam SL, Archibald V, Jassar B, Tyreman N, Gordon T. Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles *J Neurosci*. 2001 Jan 15; 21(2):654-67.

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

Teodori MJ. Regeneração axonal após reparo nervoso com enxerto de músculo esquelético: Estudo Morfométrico. [Tese]. São Paulo: UNICAMP; 2000.

Todd RB, Bowman W. In: *The physiological anatomy and physiology of man*. Phyladelphia. Blanchard and Lea, 1957; 129: 523-660. Apud Teodori MJ. Regeneração axonal através de autotransplante de retalho músculo esquelético obtido a partir de injeção de anestésico. [Dissertação]. São Paulo: UNICAMP; 1996.

Van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, Helders PJ, 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, Patricio 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.

Vecchi G. Sulla rigenerazione Del nervo sciatico in animali costretti alla corsa. *Arch Sci Med*. 1929; 53: 778-83. Apud Van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, Helders PJ, Gispen WH. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity alter sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil*. 1997; 78 (1): 70-77.

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.

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

Waxman SG, Bennet MVL. Relative conduction velocities of small myelinated and nonmyelinated fibers in the central nervous system. *Nat New Biol*. 1972, 238: 217.

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

Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, Schmalbruch H, Krarup C. Comparative Electrophysiological, Function, and Histological Studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*. 2005; 25 (6): 508-19.



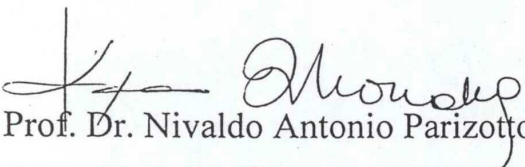
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propq@power.ufscar.br](mailto:propq@power.ufscar.br)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

---

Protocolo CEEA nº 027/2006

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

São Carlos, 5 de janeiro de 2007.

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