

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

O ambiente enriquecido como fonte de estímulos durante a fase aguda da
regeneração nervosa periférica: Análise morfométrica e funcional.

Sibele Yoko Mattozo Takeda

2007

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SIBELE YOKO MATTOZO TAKEDA

O AMBIENTE ENRIQUECIDO COMO FONTE
DE ESTÍMULOS DURANTE A FASE AGUDA DE
REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA:
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 e desenvolvimento neuromotor - Avaliação e intervenção fisioterapêutica.

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

PIRACICABA
2007

Takeda, Sibeles YM

O ambiente enriquecido como fonte de estímulos durante a fase aguda de regeneração nervosa periférica: Análise morfométrica e funcional. Piracicaba, 2007.

99p.

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

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

1. Regeneração Nervosa Periférica. 2. Ambiente Enriquecido. 3. Plasticidade Neuromuscular. 4. Axionotmese. 5. Morfometria. I. Teodori, Rosana Macher. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. III. Título

Dedico este trabalho aos meus pais, Adalberto Koodi Takeda e Inês Janete Mattozo Takeda, pelo incentivo e apoio incondicionais em todos os momentos e, além de tudo, pelo enorme respeito aos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser onipotente e onipresente em minha vida, guiando e protegendo sempre meu caminho.

Aos **meus pais**, pelo amor, carinho, compreensão e por sempre acreditarem e confiarem em minhas decisões.

À **Profa. Dra. Rosana Macher Teodori**, orientadora, pelos valiosos ensinamentos, por saber extrair o melhor de mim, pelo carinho, dedicação, amizade e incentivo presentes durante a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marco Cezar Somazz**, pela colaboração durante a coleta do material.

À **Profa. Dra. Maria Imaculada de Lima Montebelo**, pela paciência e eficiência na realização das análises estatísticas.

Aos **professores do Curso de Pós-Graduação em Fisioterapia**, pela base científica proporcionada por meio das aulas.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Metodista de Piracicaba**, que tornou possível a realização deste trabalho.

À grande amiga **Priscila Godoy Januário**, por compartilhar e, sobretudo, estar presente em todos os momentos, com opiniões, idéias e palavras de apoio.

Às amigas **Larissa Salgado de Oliveira e Luciane Lobato Sobral**, pela amizade, incentivo e colaboração durante todas as fases do trabalho.

Ao colega **Rodrigo Santiago Barbosa Rocha**, pelo auxílio durante os procedimentos no laboratório.

À aluna de iniciação científica **Joice Betini**, pelo companheirismo e apoio durante a coleta do material.

À secretária do Curso de Pós-Graduação em Fisioterapia, **Miriam Castro**, pelo auxílio prestado no decorrer do trabalho.

Aos **Funcionários da Faculdade de Ciências da Saúde da UNIMEP**, pela colaboração no período experimental.

A todos que, de alguma forma, colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho. Muito obrigada.

“Nunca o homem inventará nada mais simples nem mais belo do que uma manifestação da natureza. Dada a causa, a natureza produz o efeito no modo mais breve em que pode ser produzido.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Estudos utilizando ambientes modificados mostraram efeitos benéficos em alguns modelos de lesão encefálica. Não há relatos sobre o uso do modelo de ambiente enriquecido em lesões nervosas periféricas. Ele pode promover a movimentação precoce, a estimulação tátil e proprioceptiva após a lesão. Essa forma de estímulo poderia favorecer a regeneração nervosa, maturação e conseqüente recuperação funcional. O objetivo deste estudo foi analisar morfológica e funcionalmente o nervo isquiático de ratos submetidos a axoniotmese e subseqüente exposição ao ambiente enriquecido. Quarenta e dois ratos *Wistar* machos ($198,66 \pm 11,61g$) foram distribuídos em sete grupos (n=6): L6 - animais desnervados, mantidos em gaiola por seis dias; CON (Controle) - Animais sem lesão, mantidos em número de seis em gaiola grande padrão; IAS (Isolado Ambiente Simples) - animais desnervados, isolados em gaiola pequena padrão; IAE (Isolado Ambiente Enriquecido) - animais desnervados, isolados em gaiola enriquecida pequena; AAS (Agrupado Ambiente Simples) - animais desnervados, em número de três em gaiola grande padrão; AAE (Agrupado Ambiente Enriquecido) - animais desnervados, em número de três em gaiola enriquecida grande; L (Lesão) - animais desnervados, em número de seis em gaiola grande padrão. O nervo isquiático esquerdo foi esmagado (quatro pinçamentos de 20 s e 1 s de intervalo entre eles). Posteriormente, os animais foram distribuídos nas respectivas gaiolas. Gaiolas enriquecidas dispunham de roda de exercício, escada, rampa e compartimentos de comida e água móveis, que eram trocados de lugar diariamente, de forma aleatória. Após período experimental, o nervo isquiático de todos os animais foi coletado para análise morfológica e número de axônios. A análise funcional foi feita a partir da impressão das pegadas das patas normal e experimental no período pré-operatório, 7°, 14° e 21° dias pós-operatório (PO). Dados funcionais e morfológicos foram processados estatisticamente (*Bioestat 4.0*). O teste de *Shapiro Wilk* avaliou a distribuição dos dados. Com exceção da razão G, foram usados testes paramétricos, considerando $p < 0,05$. Os resultados deste estudo demonstraram que o número de axônios nos grupos AAE, AAS e IAS foi superior ao do grupo CON. No grupo AAS o número de axônios foi superior aos grupos L, IAE e AAE. O diâmetro dos axônios nos grupos experimentais foi inferior ao do grupo CON. O diâmetro das fibras nervosas foi menor que o CON em todos os grupos, sendo que no grupo AAS foi menor que no grupo IAE. A espessura da bainha de mielina foi menor em todos os grupos experimentais, quando comparada ao CON. O grupo AAS obteve valor inferior ao L e ao IAE e o IAS foi inferior ao L. A razão G não diferiu entre grupos. O IFC intra-grupos demonstrou que ao 7° dia PO, todos os grupos diferiram do pré-operatório, devido à ausência completa da função. No 21° dia PO a função de todos os grupos foi restabelecida, aproximando-se dos valores pré-operatórios. Na avaliação inter-grupos não houve diferença. Não foi observada correlação entre os dados morfológicos e funcionais. O exercício voluntário, estimulado por meio do ambiente enriquecido, não interferiu na regeneração e maturação das fibras nervosas, assim como na recuperação funcional.

Palavras-chave: regeneração nervosa periférica, ambiente enriquecido, plasticidade neuromuscular, axoniotmese, morfometria.

ABSTRACT

Studies related to the influence of modified environments exposition demonstrated beneficial effects on several brain injury models. There are no reports about using the enriched environment model in peripheral nerve injuries. It promotes the early movement and the tactile perception and proprioception after injury. The early voluntary movement stimulation through the enriched environment could favor the nerve regeneration, maturation and consequent functional recovery. The aim of this study was to investigate the sciatic nerve morphometric and functional parameters in rats submitted to axonotmesis and subsequent enriched environment exposition. Forty-two male Wistar rats (198.66 ±11.61g) were distributed in seven groups (n=6): L6 - animals submitted to nerve injury and kept in a cage during six days; CON (Control) - Uninjured animals, kept in a great pattern cage in a group of six rats; SIE (Simple Isolated Environment) - denervated rats, kept isolated in a small pattern cage; EIE (Enriched Isolated Environment) - denervated rats, kept isolated in a small enriched cage; SCE (Simple Clustered Environment) - denervated rats, kept in a great pattern cage in a group of three rats; ECE (Enriched Clustered Environment) - denervated rats, kept in a great enriched cage in a group of three rats; I (Injury) - denervated animals, kept in a great pattern cage in a group of six rats. The animal's sciatic nerve was crushed (four crushes using tweezers during 20s and with intervals of 1s between them), and distributed in the respective cages. The enriched cages contained exercise wheel, ladder, ramp, mobile food and water boxes. These were daily moved from place to place, randomly. After the experimental period, all animals' sciatic nerve was collected for morphometric analysis and axons number quantification. The functional analysis was performed using the normal and experimental paws footprints of the preoperative period, 7th, 14th and 21st postoperative (PO) days. Functional and morphometric data were statistically evaluated (*Bioestat 4.0*). *Shapiro Wilk* test was used to evaluate the data distribution. Except for the G ratio, parametric tests were used, and a *p* value < 0.05 was considered significant. The results demonstrated that the axons' number in the ECE, EIE, SCE and SIE groups was higher than in the CON group, and the SCE was higher than in the EIE. The axons' and fibers' diameter in the experimental groups was lower than in the CON group. The myelin sheath thickness was lower in all experimental groups, when compared to CON. The SCE showed a lower value than I and EIE, and the SIE was lower than I. No difference in the G ratio was observed among groups. The intra-groups IFC demonstrated that in the PO 7th day, all the groups differed from the preoperative, due to the complete function absence. The same was observed in the PO 14th day. All the groups' function was recovered only in the PO 21st day, becoming closer to the preoperative values. The inter-groups evaluation showed no difference. No correlation has been shown between the morphometric and functional data. The volunteer exercise, stimulated by the enriched environment, had no influence on the nerve fibers regeneration and maturation, as well as on the functional recovery.

Keywords: peripheral nerve regeneration, enriched environment, neuromuscular plasticity, axonotmesis, morphometry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO	13
2.2 LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS	15
2.2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS	15
2.2.2 DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA	17
2.3 MODELOS DE LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA	20
2.4 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MARCHA	21
2.5 EXERCÍCIO FÍSICO E REGENERAÇÃO NERVOSA	24
2.6 O MODELO DE AMBIENTE ENRIQUECIDO	27
2.7 OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO AMBIENTE ENRIQUECIDO	28
3 OBJETIVO	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 DESENHO DO ESTUDO	32
4.2 AMOSTRAGEM	32
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	33
4.3.1 EXPOSIÇÃO AO AMBIENTE ENRIQUECIDO	36
4.3.2 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA	39
4.3.3 COLETA E PROCESSAMENTO DO NERVO	41
4.4 TRATAMENTO DOS DADOS	42
4.4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	42
4.4.1.1 ANÁLISE DO NÚMERO DE AXÔNIOS	43
4.4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	44
4.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADOS	47
5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO NERVO APÓS SEIS DIAS DE LESÃO	49
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO NERVO APÓS 24 DIAS DE LESÃO	51

5.3 NÚMERO DE AXÔNIOS NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	53
5.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	54
5.5 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA	58
5.6 CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E FUNCIONAIS	61
6 DISCUSSÃO	62
6.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E MODELO DE LESÃO NERVOSA	62
6.2 REGENERAÇÃO E MATURAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA	63
6.3 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MARCHA	69
6.4 CORRELAÇÃO ENTRE O IFC E OS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS	72
6.5 EXPOSIÇÃO AO AMBIENTE ENRIQUECIDO	75
7 CONCLUSÃO	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
REFERÊNCIAS	84
ANEXO	98

1 INTRODUÇÃO

Investigações sobre as respostas do sistema nervoso central (SNC) às lesões sugerem que estímulos ambientais, assim como a interação social, podem influenciar na plasticidade do sistema nervoso. Steiner et al. (2005), utilizando um modelo experimental de doença de Parkinson, encontraram pistas de que o ambiente modificado associado ao exercício físico, aumentou a plasticidade celular. Segovia et al. (2005), também em modelo animal de lesão encefálica, verificaram que o ambiente enriquecido promovia aumento na síntese de neurotransmissores. Da mesma forma, Will et al. (2004), relataram que o ambiente enriquecido, o exercício físico e o treinamento influenciavam o processo de recuperação funcional compensatória.

Por conseguinte, uma hipótese sugerida por Passineau, Green e Dietrich (2001); Will et al. (2004); Barnea, Mishal e Nottebohm (2005), é que a exposição a novas experiências pode promover a formação de novos circuitos, equilibrar o *turnover* neural e ter um efeito neuroprotetor.

Não foram encontrados relatos sugerindo que a exposição precoce ao exercício voluntário por meio do ambiente enriquecido também possa influenciar na regeneração do sistema nervoso periférico (SNP). Nos estudos realizados por Van Meeteren et al. (1997) e Burghardt et al. (2004), os animais eram expostos diariamente a algumas horas de atividade voluntária em roda de exercício durante 24 horas e 45 minutos diários, respectivamente.

O modelo de confinamento em roda de exercício permitiu relacionar a distância percorrida à plasticidade do SNC e SNP. Entretanto avalia somente o exercício voluntário realizado nos períodos em que os animais foram confinados à

roda de exercício, sem levar em consideração a movimentação exercida no interior da gaiola. Outra questão importante discutida por Van Meeteren et al. (1997), foi que o estresse crônico proporcionado pelos treinamentos poderia afetar de forma negativa a regeneração nervosa, comprometendo a recuperação funcional.

O sistema nervoso periférico (SNP) possui características que o torna susceptível à regeneração espontânea após determinados tipos de lesão. Na axoniotmese, o nervo sofre degeneração, a qual é seguida por regeneração e conseqüente reinervação muscular (Robinson, 2000; Lundy-Ekman, 2004). O prognóstico favorável dessas formas de lesão se deve à preservação do envoltório conjuntivo e da microcirculação, apesar da perda de continuidade axonal. (Bridge et al. 1994; Gordon, Sulamain e Boyd, 2003; Ijckema-Paassen et al. 2004). Mesmo assim, essas lesões causam déficit sensitivo, motor e das funções autonômicas, que devem ser restabelecidas precocemente, pois quanto menor o tempo de reinervação melhor o prognóstico funcional. Entretanto, a recuperação funcional é um processo lento que depende da natureza, do grau da lesão e da regeneração nervosa (Eberstein, Eberstein, 1996; Lundy-Ekman, 2004).

O modelo de ambiente enriquecido proposto por Rosenzweig et al. (1961) e Will et al. (2004), desenvolvido para o estudo da plasticidade no SNC maduro após lesão, é uma forma de estimulação contínua não somente à movimentação voluntária, mas também pode proporcionar estimulação tátil e proprioceptiva, fundamentais para a recuperação funcional.

Assim, o exercício voluntário, por meio da exposição ao ambiente enriquecido, fornece estímulos para incentivar a movimentação voluntária

precocemente. A hipótese deste estudo é que esses estímulos possam influenciar o processo de regeneração nervosa, acelerando a maturação das fibras regeneradas. Os resultados poderiam sugerir novas alternativas para a reabilitação após lesão nervosa periférica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema nervoso periférico

O SNP é o responsável por estabelecer comunicação entre as várias estruturas do corpo e o SNC (Bear, Connors e Paradiso, 2002).

Os nervos são constituídos por dois tipos característicos de fibras: mielínicas e amielínicas. As fibras mielínicas, caracterizadas pela presença da bainha de mielina, são encontradas principalmente nos nervos espinhais e seus ramos. As fibras amielínicas apresentam delgado envoltório lipoprotéico e estão presentes principalmente no sistema nervoso autônomo (Coelho, Fortunato e Moreira, 2001).

Os nervos motores e sensitivos são formados por feixes de axônios sustentados por camadas de tecido conjuntivo: endoneuro, perineuro e epineuro. Cada feixe de fibras é constituído por axônios, os quais são envolvidos separadamente por uma fina camada conjuntiva denominada endoneuro. O tecido conjuntivo frouxo que o constitui é formado por fibras colágenas do tipo I, em maiores proporções e fibras do tipo III, além de possuir considerável rede vascular. O perineuro, responsável por revestir os fascículos nervosos, é formado por tecido conjuntivo denso. Estruturalmente constitui-se de duas camadas: externa (formada por fibras colágenas do tipo I) e interna (formada por fibras colágenas do tipo III). É organizado em arranjos monocelulares, intercalados por fibras colágenas. O epineuro, que recobre o nervo é formado por duas camadas: interna e externa. Elas apresentam predominância de fibras colágenas do tipo I, grande quantidade de fibrócitos e fibroblastos, além de possuírem vasos

sanguíneos de maior calibre. O espaço entre os fascículos, denominado de septo epineural, é preenchido por tecido conjuntivo frouxo rico em adipócitos (Guimarães et al., 2006). Devido à sua composição estrutural, os envoltórios conjuntivos que sustentam o nervo, possuem ao mesmo tempo resistência e razoável capacidade de distensão. A presença de fibrócitos, fibroblastos e ampla rede vascular nesses envoltórios, conferem a essas bainhas grande potencial de reestruturação celular após lesão (Rempel, Dahlin e Lundborg, 1999; Pachioni et al., 2006; Topp e Boyd, 2006).

A mielina que envolve cada fibra nervosa mielínica no SNP é sintetizada pelas células de Schwann, que possuem núcleo alongado disposto paralelamente ao axônio (Chen, Yu e Strickland, 2007). Além disso, estas células mantêm a bainha de mielina, a qual está relacionada ao incremento na velocidade de condução nervosa, por atuar como isolante elétrico. A bainha formada por estas células é essencialmente lipídica, apresentado em sua composição 80% de lipídios, sendo o restante formado por proteínas (Graça et al., 2001).

O nervo isquiático é considerado o maior nervo do corpo humano, responsável pela inervação de todo o membro inferior. Ele é formado pela união dos ramos primários anteriores de L₄, L₅, S₁, S₂ e S₃ (Ferreira, 2006). Seu trajeto possui estreito contato ósseo com o forame isquiático maior e a parte posterior do osso isquiático, assim como com os músculos posteriores da coxa. Dele se originam ramos menores que irão inervar as articulações e os músculos anteriores e posteriores de todo o membro inferior (Goss, 1988; Bear, Connor, Paradiso, 2002).

2.2 Lesões nervosas periféricas

É grande a incidência de lesões traumáticas acometendo os nervos periféricos. Elas representam baixo grau de mortalidade, porém elevado período de internação hospitalar e grandes índices de incapacidade (Koizumi, 1992; Guimarães, 2006). Koizumi (1992) e Canto, Bueno e Pereira (1993) apontam que a pelve e os membros inferiores são as regiões mais atingidas em acidentes motociclísticos. Além disso, verificou-se que a lesão do nervo isquiático está diretamente relacionada a traumas que envolvem lesão vascular simultânea (Pachioni et al., 2006). A lesão também pode ser secundária à artroplastia de quadril (Macedo, Galia, Rosito et al., 2002), ou ainda decorrente de malformação vascular congênita (Bez et al., 2006).

Os nervos apresentam estruturas elásticas que permitem certo grau de distensibilidade. Quando sua capacidade de distensão é excedida, a estrutura do nervo é danificada e a passagem dos impulsos nervosos é interrompida. As lesões mais freqüentes são causadas por estiramentos, seguidas por lacerações e lesões por esmagamento. O grau de comprometimento das estruturas nervosas implica diretamente no prognóstico funcional (Jacques e Kline, 2000).

2.2.1 Classificação das lesões nervosas periféricas

As lesões nervosas periféricas foram inicialmente classificadas em três categorias (Seddon, 1945 citado por Burnett e Zager, 2004): neuropraxia, axoniotmese e neurotmese.

A neuropraxia é caracterizada por um bloqueio local e transitório da passagem do impulso nervoso, decorrente de lesão na bainha de mielina. Por não haver danos axonais, não desencadeia processo de degeneração. A forma mais comum é a “paralisia do sábado à noite”, onde os componentes mecânicos e vasculares parecem ter um papel importante na etiologia.

Na axoniotmese ocorre perda de continuidade axonal. Esse tipo de lesão desencadeia uma cascata de reações que visa degradar os resíduos celulares a partir do local da lesão, num processo de degeneração anterógrada (degeneração Walleriana), fundamental para que ocorra a regeneração. Dessa maneira, o órgão-alvo perde sua conexão nervosa, assim como sua função sensorio-motora. Grande parte das lesões por esmagamento é classificada como axoniotmese e, por preservarem a estrutura de sustentação do nervo, possuem bom prognóstico funcional (Chen, Yu e Strickland, 2007).

A neurotmese definida por Seddon envolve o comprometimento axonal e das bainhas conjuntivas. Essa forma de lesão implica necessariamente na escolha de condutas de reparo que proporcionem reconexão entre os cotos proximal e distal (Ijkema-Passen et al., 2004).

Em 1978, Sunderland aperfeiçoou a classificação proposta por Seddon, baseando-se no grau de acometimento das estruturas conjuntivas, propondo uma classificação que abrange cinco categorias. A lesão de grau I confere danos locais à bainha de mielina que não desencadeiam degeneração Walleriana. A lesão de grau II é caracterizada pela destruição do perineuro e epineuro, porém com preservação do endoneuro. As lesões de graus III, IV são estágios intermediários entre a axoniotmese e a neurotmese, descritas por Seddon. A lesão de grau III foi definida como sendo a ruptura axonal com lesão parcial do

endoneuro. Na lesão grau IV somente o epineuro é preservado, enquanto no grau V, há solução de continuidade axonal e de todos os envoltórios conjuntivos (Burnett e Zager, 2004).

Entretanto, a classificação mais utilizada atualmente é a de Seddon (1945).

2.2.2 Degeneração e regeneração nervosa periférica

Devido às suas características estruturais, o SNP possui grande capacidade de regeneração. A partir do momento que ocorre um desarranjo dos componentes que constituem a fibra nervosa, uma cascata de reações é desencadeada (Chen, Yu e Strickland, 2007), visando à degeneração e conseqüente regeneração nervosa.

A degeneração Walleriana é condição *sine qua non* para que ocorra a regeneração. Caracteriza-se por alterações histológicas importantes, que são mediadas pelo cálcio. As células de Schwann desempenham papel fundamental como sinalizadoras de lesão, na remoção de detritos e na reorganização celular. Para isso, estas células se multiplicam e se diferenciam com o propósito de auxiliar a atividade fagocitária dos macrófagos na remoção dos resíduos de axônios e mielina degenerados (Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

Os macrófagos desempenham papel importante durante o processo de remoção dos resíduos de mielina. Eles também são responsáveis pela secreção de moléculas regulatórias, tróficas e tóxicas, além de citocinas e radicais livres. Estas moléculas são fundamentais durante a degeneração e regeneração do SNP (Müller et al., 2001).

Outro fator importante a ser considerado é a presença do cálcio no processo de degeneração do citoesqueleto axonal. Parece evidente a relação entre o aumento da concentração de cálcio e a ativação de proteases, como a calpaína (Martinez e Ribeiro, 1998). A calpaína está presente na composição da mielina, tanto no SNC quanto no SNP. Traumas mecânicos, como os observados nas lesões por esmagamento, ocasionam aumento do influxo de cálcio nos tecidos perineurais, estimulando a atividade da calpaína. Ela é capaz de reagir a mínimas alterações estruturais na bainha de mielina, auxiliando na sua degradação (Martinez e Canavaro, 2000).

Tanto o segmento nervoso distal quanto o proximal à lesão sofrem importantes modificações no decorrer da regeneração. Os transtornos decorrentes da lesão axonal e conseqüentes alterações no corpo celular estimulam a síntese de fatores de crescimento (Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005). Dentre as modificações sofridas pelo corpo celular estão o seu intumescimento, o aumento da síntese protéica e o deslocamento do núcleo para a periferia. Essas modificações observadas durante a cromatólise são responsáveis por inverter a ordem normal de substâncias sintetizadas. Devido à interrupção do impulso nervoso, ocorre aumento da síntese protéica e conseqüente diminuição da produção de neurotransmissores (Burnett e Zager, 2004).

Lesões de grande extensão e alto grau de acometimento das estruturas nervosas podem comprometer o corpo celular e levar à morte da célula nervosa (Stoll e Müller, 1999), impossibilitando a regeneração.

Os fatores de crescimento produzidos pelo corpo celular irão contribuir para a formação do cone de crescimento, representado por uma dilatação na

extremidade axonal, de onde partem prolongamentos que darão origem a neuritos. De cada axônio, partem de 2 a 3 brotos que seguirão até o órgão-alvo, mediados por fatores tróficos secretados pelas células de Schwann. À medida que os detritos de axônios e mielina são removidos, as células de Schwann se alinham entre a membrana basal e o endoneuro e, a partir da interdigitação de seus citoplasmas, formam os túneis de células de Schwann, ou bandas *de Büngner*, que servem de base de sustentação e direcionamento dos brotos que crescem em direção ao músculo (Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

A reinervação muscular após axoniotmese inicia duas semanas após a lesão. As fibras nervosas destacam-se do tronco nervoso e distribuem-se entre as fibras musculares. A partir do 14º dia inicia a poliinervação, que tem seu ponto máximo entre o 21º e 25º dia. A poliinervação acontece quando mais de um terminal nervoso estabelece contato com os receptores de acetilcolina da junção neuromuscular. Assim que as características biofísicas do terminal nervoso e da junção neuromuscular recuperam os padrões normais, ocorre redução de fatores de crescimento, liberados tanto pelo músculo quanto pelo corpo celular, o que leva à diminuição dos contatos sinápticos excedentes, conhecida como eliminação sináptica (Gorio et al., 1983; Carmignoto et al., 1983).

Quando ocorre o acoplamento terminal nervoso-junção neuromuscular, as células de Schwann terminais deixam de liberar fatores tróficos que favorecem o crescimento axonal e a reinervação. Elas tornam-se responsáveis pela estabilidade da estrutura juncional, estabelecendo pontes entre as junções inervadas e desnervadas. Com a contração muscular restabelecida, também cessa o estímulo dos fatores tróficos liberados pelo músculo, que deixa de ser inativo (Love, Son e Thompson, 2002).

As lesões por secção comprometem as estruturas de sustentação axonal e, por isso, dependem de reparo cirúrgico adequado. A solução de continuidade requer a união entre os cotos proximal e distal ou ainda o emprego de enxertos, quando a extensão da lesão não permite a sutura entre os cotos. Os enxertos podem ser feitos por meio de ramos nervosos sensitivos do próprio paciente ou ainda por diversos tipos de materiais. Entretanto, o comprometimento de nervo íntegro para servir como enxerto, a presença de parestesia ou anestesia no seu território de inervação e excesso de tecido cicatricial no local da sutura, são algumas das dificuldades encontradas após neurotome (Santo Neto et al., 1998), afetando o restabelecimento da passagem nervosa e o prognóstico funcional.

Estudos eletrofisiológicos, histológicos e funcionais apontam grandes diferenças na regeneração entre lesões por esmagamento e por secção. Enquanto a primeira se restabelece de forma mais rápida e eficiente, a segunda possui recuperação lenta e um prognóstico funcional reservado (Wolthers et al., 2005).

2.3 Modelos de lesão nervosa periférica

Lesões nervosas periféricas podem ser causadas por compressão, estiramento ou secção. Homogeneizar essas formas de lesão para viabilizar seu emprego em estudos experimentais é um desafio. A lesão por esmagamento é largamente empregada devido à fácil aplicabilidade e suscetibilidade à regeneração sem necessidade de intervenção cirúrgica (Ijkema-Passen et al., 2004).

O grau de severidade da lesão é proporcional ao recurso utilizado para promover o dano tecidual. A existência de vários procedimentos que visam a reprodução do modelo de lesão por axoniotmese exigiu que eles fossem melhor investigados.

Com intuito de conhecer a efetividade e a extensão da lesão provocada, foram usados diversos dispositivos de compressão, como pinças de relojoeiro e hemostática, além de equipamentos de carga fixa. Os tempos de compressão variaram entre quinze segundos e 1 minuto. Foi verificado que em todos os procedimentos as lesões ocorreram de forma efetiva, desencadeando degeneração Walleriana (Bridge et al., 1994; Marques, 1992; Monte-Raso, Barbieri e Mazzer, 2006).

2.4 Avaliação funcional da marcha

Várias técnicas de avaliação das lesões nervosas periféricas são empregadas com o objetivo de estudar a recuperação funcional após a regeneração. Dentre elas estão as análises morfométricas, histológicas e eletrofisiológicas (Monte-Raso, Barbieri e Mazzer, 2006).

Essas formas de avaliação refletem objetivamente parâmetros relevantes da estrutura do nervo (diâmetro de axônio e fibra nervosa e espessura da bainha de mielina) e dos processos biológicos envolvidos na reorganização celular e molecular. Porém, nem sempre esses parâmetros correspondem ao restabelecimento da função (Dash et al., 1996).

Hurska, Kennedy e Silbergeld (1979) estabeleceram um método de avaliação funcional após lesão nervosa periférica em ratos. A forma de análise

proposta baseou-se no padrão de marcha desenvolvido pelos animais após lesão nervosa periférica. A avaliação é sustentada pelas características das pegadas dos animais, todavia dá igual importância às medidas da distância entre as pegadas e ângulo da pata. Posteriormente, algumas medidas foram descartadas por serem consideradas vulneráveis a variações, podendo interferir na confiabilidade da análise (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982; Bain, Mackinnon e Hunter, 1989).

Reynolds et al. (1996) relataram haver direta relação entre a função dos músculos posteriores e a impressão da pata do animal. Assim, foram desenvolvidos aparatos para a impressão das pegadas, constituídos por corredores contendo uma caixa escura ao final. Os animais eram dispostos previamente no aparato para se ambientar ao local de teste. Em seguida, as patas posteriores eram marcadas e as pegadas impressas em papel (Varejão et al., 2004).

Para avaliação da marcha é considerada a largura da pegada, expresso pela distância entre o primeiro e quinto artelhos (TS), a largura intermediária da pegada, equivalente à distância entre o segundo e o quarto artelhos (ITS) e o comprimento da pegada medida pela distância entre o terceiro artelho e o calcâneo (PL). Tanto a pata normal quanto aquela submetida à lesão nervosa são avaliadas (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982).

Bain, Mackinnon e Hunter (1989), propuseram uma fórmula onde a aplicação dessas medidas indica a relação existente entre os músculos inervados pelo nervo isquiático e os padrões de marcha adotados pelos animais, após lesão nervosa, para estabelecer o SFI (*Sciatic Functional Index*).

Os valores pré-operatórios que expressam a função normal devem estar entre 0 e ± 20 (Hare et al., 1990). Segundo De Medinacelli, Freed e Wyatt (1982), os animais com perda total da função, expressaram valores próximos a $\bar{100}$, chegando até a $\bar{139}$.

Em princípio, lesões do tipo axoniotmese apresentam bom prognóstico funcional. Entretanto, existem fatores que contribuem para que a função não seja recuperada, como o estabelecimento de conexões inapropriadas das fibras com seus órgãos-alvo, aderências, atrofia e contraturas musculares decorrentes do tempo de imobilização.

Há ainda, situações que inviabilizam a mensuração das pegadas, como a presença de contraturas em flexão plantar decorrentes de lesão do nervo isquiático e tibial, fazendo com que o animal caminhe com o dorso da pata. A proliferação de tecido fibroso ainda pode cursar com a incidência de eversão e dorsiflexão, deixando o quinto artelho elevado durante a impressão das pegadas, limitando a análise das medidas. Outros fatores, como autotomia e padrões anormais de movimentação compensatória, podem inviabilizar a avaliação funcional (Hare et al., 1990; Varejão et al., 2004).

Apesar das limitações apontadas, a avaliação da função por meio do cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC) é ainda a mais utilizada experimentalmente, por apresentar bom nível de confiabilidade e facilidade para realização.

2.5 Exercício físico e regeneração nervosa

O exercício físico pode ser capaz de manter e/ou compensar algumas funções comprometidas após lesões traumáticas do sistema nervoso. Isso ocorre por meio da expressão de fatores neurotróficos, que favorecem o restabelecimento do fluxo de informações entre o sistema nervoso central e periférico (Kempermann, Praag e Gage, 2000).

Causing et al. (1997) destacam a importância dos fatores neurotróficos na plasticidade atividade-dependente, considerando que o aumento da liberação desses fatores pode modular a transmissão sináptica e a excitabilidade neuronal.

Dentre os fatores neurotróficos que desempenham papéis relevantes nos mecanismos de plasticidade do SNC estão a sinapsina I, a proteína associada ao crescimento (GAP-43), o CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*), o fator neurotrófico ciliar (CNTF) e a neurotrofina 3 (NT3) (Molteni et al., 2004; Pan et al., 2007). A sinapsina I, pertence à família das fosfoproteínas específicas do terminal nervoso e está relacionada ao incremento da transmissão nervosa, crescimento axonal e manutenção dos contatos sinápticos. O fator GAP-43, presente nos terminais nervosos em crescimento, auxilia no crescimento axonal, na modulação da transmissão sináptica e nos processos que envolvem aprendizagem e memória (Routtenberg et al., 2000). O CREB está relacionado ao aprendizado espacial, além de ter papel singular na expressão gênica de fatores neurotróficos (Finkbeiner, 2000).

O CNTF é sintetizado tanto pelos astrócitos no SNC, quanto pelas células de Schwann no SNP, possuindo papel fundamental não somente durante o processo de regeneração, mas também na manutenção da integridade da

estrutura do nervo periférico (Pan et al., 2007). Smith et al. (1993) observaram que logo após lesão por esmagamento do nervo isquiático, houve redução dos níveis de CNTF a partir do local do esmagamento, seguido por diminuição nas regiões adjacentes à lesão. Entretanto esses níveis são restabelecidos após a degeneração dos restos celulares.

O fator NT-3 está diretamente relacionado à eficiência sináptica. Assim, níveis elevados de NT-3 promovem aumento da excitabilidade periférica, permitindo maior rapidez e eficiência na passagem da informação tátil e proprioceptiva (Carroll et al., 1998).

Outro estudo demonstrando os efeitos da NT-3 foi realizado em lesão parcial da medula espinhal. Verificou-se que o exercício realizado na roda de exercício promoveu incremento da expressão gênica de NT-3, o qual foi encontrado na medula espinhal, nos músculos e neurônios sensoriais. Tais fatores contribuíram na modulação do estímulo nervoso na medula, melhorando a função sensorial (Hutchinson et al., 2004).

Em pesquisa comparando ratos sedentários e submetidos ao exercício voluntário, foi verificado um aumento significativo de Sinapsina I e GAP-43. Também foi demonstrado que para a manutenção dos níveis desses fatores era necessária uma quantidade mínima de atividade muscular. Sugeriu-se que o exercício físico poderia atuar como modulador da expressão gênica de fatores neurotróficos, essenciais para a plasticidade. A melhora da função sensorial pareceu estar relacionada ao aumento de agentes tróficos, tanto no músculo como nas estruturas centrais (Gómez-Pinilla et al., 2004).

Molteni et al. (2004), em estudo envolvendo lesão nervosa periférica, demonstraram a relação entre atividade física voluntária e o aumento da

expressão de fatores tróficos durante a regeneração nervosa. A distância percorrida pelos animais foi diretamente proporcional ao incremento da expressão de neurotrofinas. Além disso, o exercício proporcionou maior crescimento axonal quando comparado a ratos sedentários.

Protocolos de exercício de diversas modalidades foram desenvolvidos no sentido de investigar o processo de regeneração nervosa periférica (Marqueste et al., 2004). Os benefícios que os treinamentos utilizando roda de exercício, natação ou corrida em esteira trazem ao músculo são incontestáveis, sendo que vários deles favoreceram também a regeneração nervosa periférica (Byun et al., 2005).

Apesar da contribuição que o exercício, de modo geral, pode promover durante a regeneração, verificou-se que modalidades diferentes de exercício produziam efeitos distintos na modulação da expressão de fatores neurotróficos. Trabalhos, empregando protocolos de atividade por longos períodos de tempo exacerbaram a lesão na medula espinal. O mesmo não ocorreu quando foram empregados exercícios de baixa intensidade, por períodos menores de tempo (Kozłowski, James e Schallet, 1996).

Ainda são controversas as questões acerca de qual a melhor intensidade do exercício e até que ponto poderia interferir negativamente na regeneração nervosa periférica. As possíveis repercussões dos diversos protocolos de treinamento sobre a regeneração nervosa periférica ainda não foram totalmente esclarecidas (Van Meeteren et al., 1997).

2.6 O modelo de ambiente enriquecido

Rosenzweig, Krech e Bennet (1961) desenvolveram um modelo de ambiente enriquecido para o estudo da plasticidade no SNC maduro após lesão. O ambiente enriquecido é uma forma de estimulação contínua que favorece a movimentação voluntária, promovendo ainda estímulo tátil e proprioceptivo, fundamentais à recuperação funcional.

Esses ambientes se caracterizam por apresentar maior dimensão, com várias vias de acesso, pela utilização de palhas e ração de diferentes tipos e rodas de exercício. De maneira geral, os artifícios presentes no ambiente devem estimular a aquisição de novas experiências e novas habilidades (Biernaski e Corbett, 2001).

Rodas de exercícios geralmente fazem parte de ambientes enriquecidos, proporcionando aumento da atividade física. Entretanto, quando este recurso é utilizado de maneira isolada em protocolos de confinamento, não se caracteriza um ambiente modificado (Gentile, Beheshti e Held, 1987).

Outra questão importante a ser analisada quando se trata de ambientes enriquecidos diz respeito ao número de animais dispostos por gaiola. Não existe consenso sobre o padrão de movimentação em animais mantidos isolados e em grupo, tanto em ambientes pobres de estímulos, quanto nos enriquecidos (Varty et al., 2000).

Alguns trabalhos demonstraram que animais dispostos isoladamente em ambientes enriquecidos apresentavam maior comportamento exploratório em relação aos mantidos agrupados em tais ambientes (Gentile, Beheshti e Held, 1987). Períodos prolongados de permanência em ambientes modificados

mostraram diminuição da exploração. Conseqüentemente, a taxa de locomoção desses animais ficava prejudicada (Gentile, Beheshti e Held, 1987; Varty et al., 2000).

Entretanto, Klinstova e Greenough (1999) relataram que grupos de animais expostos a ambientes modificados apresentaram incremento na ramificação dendrítica, maior número de contatos sinápticos e aumento da expressão de fatores tróficos em relação aos mantidos isolados nesses ambientes.

2.7 Efeitos da exposição ao ambiente enriquecido

O estudo dos efeitos da exposição a ambientes enriquecidos teve início com as pesquisas envolvendo lesões do SNC. Vários modelos de lesão encefálica foram propostos, utilizando-se como recurso as modificações ambientais, que promoviam estímulos de diversas naturezas, utilizando gaiolas de maiores dimensões, vias de acesso diferenciadas (rampas, escadas e túneis), diferentes tipos de revestimento (maravalha, tela de metal) e de ração, expondo os animais a novas experiências sensório-motoras (Passineau, Green e Dietrich, 2001; Meltzer, Yabaluri e Deisseroth, 2005; Barnea, Mishal e Nottebohm, 2005).

Tendo em vista as características estruturais e funcionais do SNC adulto, pode-se dizer que ele está em constante equilíbrio entre a quantidade de células nervosas que se desenvolvem e o grau de apoptose. Lesões degenerativas e traumáticas que acometem estruturas do SNC abalam o *turnover* neural, ocasionando *déficits* cognitivos, motores e sensoriais (Meltzer, Yabaluri e Deisseroth, 2005).

Os ambientes modificados são capazes de favorecer estímulos que promovem alterações neurais importantes para o restabelecimento das funções após lesão do sistema nervoso (Oliveira, Salina e Annunziato, 2001).

Alguns trabalhos empregando o modelo de ambiente enriquecido foram propostos com o intuito de averiguar quais seriam as repercussões desses ambientes no SNC maduro após lesão. O modelo 6-OHDA, que induz a doença de Parkinson, foi usado para investigar os efeitos centrais da exposição a ambientes modificados. Nesse estudo foi possível detectar o aumento de células da substância negra. Esse incremento de substância trófica é evidenciado pela melhora no equilíbrio e na locomoção desses animais, observados após sete semanas de exposição a ambiente enriquecido (Steiner et al., 2005).

A neurogênese de células do giro denteado foi investigada com o propósito de conhecer se a exposição a ambientes modificados influenciava a execução de tarefas que requerem discriminação temporal e espacial. Verificou-se que os animais conseguiram realizar as tarefas a que eram treinados de forma mais rápida e eficiente que os demais. Essa forma de estimulação ambiental promoveu aumento na produção de glutamato e GABA no hipocampo, área responsável pela execução de atividades que necessitam dessas duas formas de discriminação (Segovia et al., 2005).

Will et al. (2004) investigaram os efeitos da movimentação voluntária estimulada por meio da exposição ao ambiente enriquecido e por treinamentos utilizando roda de exercício. Verificaram que a exposição a estímulos ambientais e o treinamento pareceram favorecer o processo de recuperação funcional compensatória, porém em proporções distintas. Dentre as duas formas de

estimulação, o ambiente enriquecido pareceu minimizar as repercussões das lesões centrais, de forma a viabilizar o melhor desempenho motor.

A recuperação funcional compensatória envolve mecanismos que visam restaurar a função total ou parcialmente perdida em decorrência da lesão, tanto central quanto periférica. O SNC reage à exposição a novas experiências por meio da formação de novos circuitos, equilíbrio do *turnover* neural e pelo efeito neuroprotetor. Esses eventos repercutem em estruturas além do SNC, proporcionando melhora em *déficits* motores e sensoriais provocados por lesões encefálicas (Passineau, Green e Dietrich, 2001; Will et al., 2004; Barnea, Mishal e Nottebohm, 2005).

De modo geral, o ambiente enriquecido proporciona oportunidade para novas experiências sensório-motoras, que melhoraram a qualidade da integração entre o sistema nervoso central e periférico. Animais expostos a ambientes enriquecidos são capazes de adquirir novas habilidades de forma mais rápida que os demais. Entretanto, se habitua rapidamente, alterando seu comportamento motor. Uma tentativa de reduzir a habituação é substituir ou trocar periodicamente de lugar os artifícios ambientais que servem como fonte de estímulo. Desse modo, os animais estariam constantemente sob a influência de novos estímulos, podendo permanecer por tempos prolongados nesses ambientes sem que a habituação interfira na locomoção (Gentile, Baheshti e Held, 1987).

Tendo em vista que os estímulos provenientes do ambiente podem promover alterações importantes no SNC, este estudo investigou sua influência no processo de regeneração e maturação do SNP, considerando a importância do tema para a reabilitação de lesões nervosas periféricas.

3 OBJETIVO

Analisar as características morfométricas e funcionais do nervo isquiático de ratos submetidos a exercício voluntário precoce por meio do ambiente enriquecido, após axoniotmese e verificar a correlação entre os parâmetros morfométricos e funcionais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O estudo caracterizou-se por uma pesquisa do tipo experimental randomizada. Foi realizado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob protocolo nº046/2007.

4.2 Amostragem

Foram utilizados 42 ratos Wistar machos, com idade entre seis e sete semanas com $198,66 \pm 11,61$ g de massa corporal, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde – UNIMEP, distribuídos aleatoriamente em sete grupos (n=6).

CON: Controle - Animais sem qualquer tipo de lesão, mantidos em gaiola de polietileno grande padrão.

L6: Lesão (seis dias) – Animais submetidos à lesão do nervo isquiático e mantidos em gaiola padrão por seis dias.

L: Lesão – Ratos submetidos à lesão do nervo isquiático e mantidos nas mesmas condições do grupo controle.

IAS: Isolado Ambiente Simples - Ratos submetidos à lesão do nervo isquiático e dispostos individualmente em gaiola de polietileno pequena padrão.

IAE: Isolado Ambiente Enriquecido - Ratos submetidos à lesão do nervo isquiático e dispostos individualmente em gaiola enriquecida pequena.

AAS: Agrupado Ambiente Simples - Ratos submetidos à lesão do nervo isquiático e agrupados em número de três em gaiola de polietileno grande padrão.

AAE: Agrupado Ambiente Enriquecido - Ratos submetidos à lesão do nervo isquiático e agrupados em número de três em gaiola enriquecida grande.

Com exceção do grupo L6, todos os animais foram mantidos nas respectivas condições experimentais durante 24 dias após a lesão nervosa.

4.3 Procedimentos Experimentais

Todos os procedimentos experimentais, assim como as análises foram realizados no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular do Programa de Pós-Graduação, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP.

Os animais dos grupos IAE, IAS, AAE, AAS, L e L6 foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (50mg/mL) e cloridrato de xilazina (2g/100mL), na proporção de 1:1, na dose de 0,3mL/100g de massa corporal – (i.m.). A região glútea esquerda foi tricotomizada, realizando-se uma incisão de aproximadamente 1,5 cm na pele, sendo os músculos divulsionados para exposição do nervo isquiático (Figura 1A). Em seguida, sob microscópio cirúrgico (DF Vasconcellos[®]), o nervo foi esmagado (quatro pinçamentos de 20 segundos, com intervalo de 1 segundo entre eles), de acordo com Fernandes et al. (2005), com pinça hemostática de 12 cm (Erwin Guth[®]), conforme mostra a Figura 1B. Após a lesão, as condições macroscópicas do nervo foram verificadas para se constatar a lesão axonal sem que houvesse perda da continuidade dos

envoltórios do nervo, conforma mostra a Figura 1C. Em seguida, os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio monofilamento nylon (Ethicon 6-0).

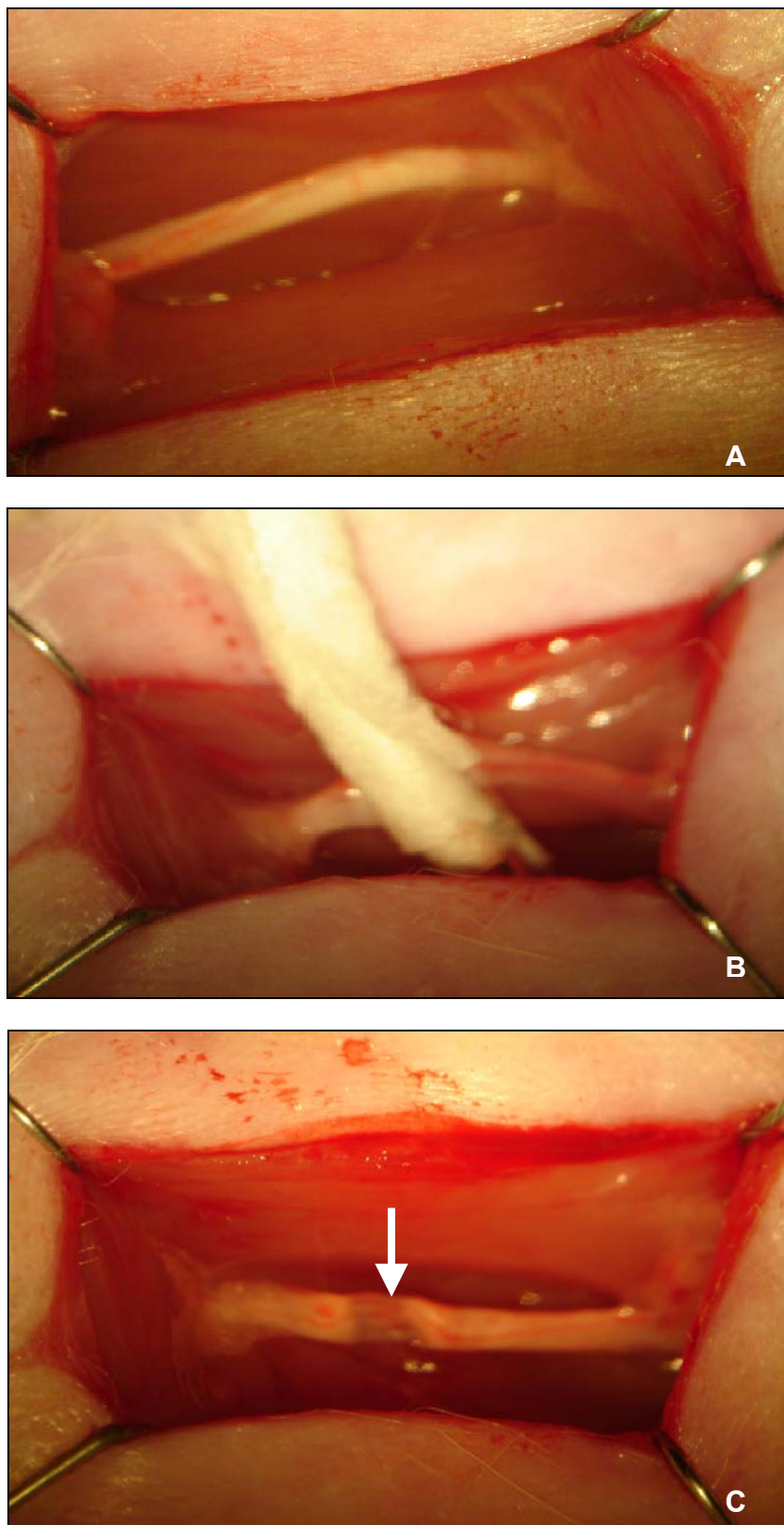


Figura 1: Nervo isquiático exposto (A), procedimento para esmagamento nervoso (B) e caracterização macroscópica do nervo após lesão (C), a seta indica o aspecto translúcido do nervo no local do esmagamento. Aumento= 62.2 x.

Nas primeiras 24 horas pós-operatório foi administrada dipirona sódica 500mg/mL (4 μ L a cada 12 horas – v.o.). Durante o experimento os animais permaneceram no biotério sob ciclo fotoperiódico de 12/12 horas, temperatura de 23 \pm 2°C e livre acesso à água e ração peletizada (Labina-Purina[®]).

4.3.1 Exposição ao Ambiente Enriquecido

Logo após o procedimento cirúrgico, os animais dos seis grupos foram dispostos separadamente até o terceiro dia pós-operatório (PO), para recuperação cirúrgica. No 4º dia PO, foram expostos às condições experimentais propostas, alojados separadamente ou agrupados em número de três em gaiolas enriquecidas ou padrão (Varty et al., 2000), de acordo com os grupos experimentais. As dimensões das gaiolas enriquecidas e padrão foram proporcionais ao número de animais nelas alocados.

As dimensões das gaiolas enriquecidas pequenas eram: 43X24X38 cm, com compartimentos de comida e água móveis e uma roda de exercício. As gaiolas enriquecidas grandes, com 38X60X24 cm de dimensão, eram constituídas por três andares interligados por escadas e rampas, duas rodas de exercício e dispositivos de comida e água móveis (Will et al., 2004), conforme mostra a Figura 2.

Durante o período experimental, os dispositivos de ração e água tiveram sua disposição alterada diariamente, de forma aleatória dentro das gaiolas. As gaiolas padrão permaneceram com seus compartimentos de água e ração em locais fixos (Figura 3).



Figura 2: Animal do grupo IAE, em gaiola enriquecida pequena (A) e do grupo AAE, em gaiola enriquecida grande (B). Observar os dispositivos que compõem cada ambiente.



Figura 3: Caixa de polietileno pequena padrão (A), com dimensões de 17X13X28 cm e caixa de polietileno grande padrão (B), de 30X13X44 cm. Ambas apresentam dispositivos de comida e água fixos.

4.3.2 Análise Funcional da Marcha

Para análise funcional da marcha, foi utilizada uma passarela de 8,2 x 42,0 cm contendo uma caixa escura em sua extremidade (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982).

Inicialmente, os animais foram colocados para caminhar no aparato, para que se habituassem ao ambiente, que posteriormente foi revestido com papel sulfite branco. Os animais tiveram as patas posteriores marcadas com tinta de impressão digital (Figura 4), sendo colocados para caminhar sobre a passarela (Figura 5).



Figura 4: Procedimento para marcação das patas dos animais.



Figura 5: Impressão das pegadas para análise funcional da marcha.

Dessa maneira, obteve-se o registro da impressão das patas normal (N) e experimental (E), nos períodos: pré-operatório, 7º, 14º, 21º dia PO.

Utilizando-se um paquímetro digital (*MITUTOYO*®), foram obtidas as seguintes medidas das patas experimental e normal: Comprimento da Pegada (PL) - entre a extremidade do terceiro artelho e o calcâneo; Largura da Pegada (TS) - entre o primeiro e o quinto artelho e Largura Intermediária da Pegada (ITS) - entre o segundo e quarto artelho (Figura 6).

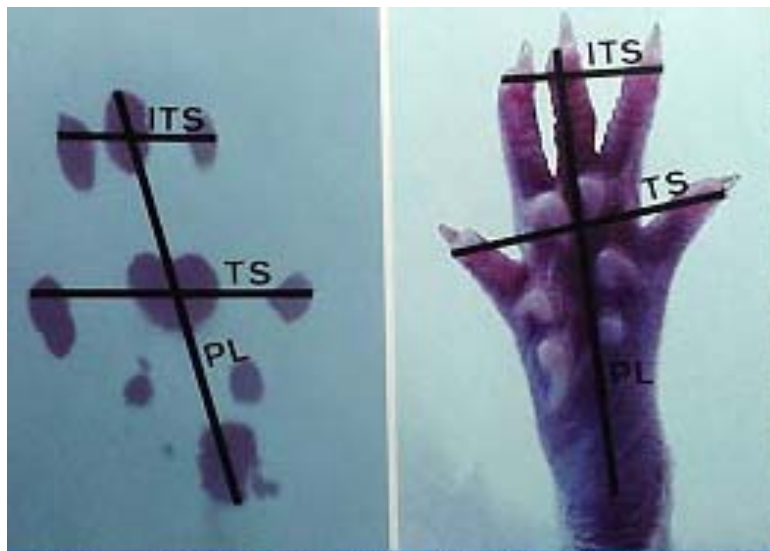


Figura 6: Pontos de referência para o cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC).
Fonte: Varejão et al. (2004).

Os valores mensurados em todos os períodos da análise foram aplicados na equação descrita a seguir, proposta por Bain, Mackinnon e Hunter (1989):

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

Os resultados obtidos expressam a função da musculatura da pata acometida, sendo que o valor 0 ± 20 (Hare et al., 1990) representa a função normal ou ausência de disfunção e o valor -100 a -139 (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982) representa a perda total da função nervosa.

4.3.3 Coleta e processamento do nervo

No 24º dia, todos os animais foram pesados e anestesiados de forma idêntica à da cirurgia para lesão nervosa. Em seguida, o nervo isquiático

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

Foram obtidos cortes transversais de 1µm, com navalha de vidro em ultramicrótomo LKB e, em seguida, corados com azul de Toluidina a 1% em solução aquosa de bórax, para observação em microscopia óptica.

Após a retirada do nervo, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Para comprovar a eficácia do protocolo de esmagamento utilizado, um grupo de seis animais teve o nervo isquiático coletado e processado para análise em microscopia óptica após seis dias da lesão nervosa, seguindo os mesmos procedimentos utilizados para análise histológica do nervo dos animais dos grupos experimentais.

4.4 Tratamento dos dados

4.4.1 Análise Histológica

Analisou-se um corte por animal em cada grupo, do qual foram obtidas imagens em objetiva de 10x, para observação da área total do nervo e em objetiva de 100x, para seleção da amostra. A amostra constitui-se de cinco

campos aleatoriamente definidos em cada corte, cujo contorno foi medido para se conhecer a área de cada campo. Esses procedimentos foram realizados com o auxílio do programa *Image Pró Plus (Média Cybernetics®)*.

Os cortes semifinos corados com azul de toluidina foram observados em microscópio de luz, sendo analisadas as características do nervo normal e regenerado nos diferentes grupos experimentais.

4.4.1.1 Análise do número de axônios

Para quantificação dos axônios, bem como para análise morfométrica, axônios em degeneração, com dupla mielinização e aqueles parcialmente fora dos campos foram excluídos.

O número total de axônios em cada nervo foi calculado a partir da somatória da área obtida nos cinco campos, em objetiva de 100X, sendo estabelecida uma proporção desta com a área total do nervo, obtida em objetiva de 10X (Figura 7). O cálculo utilizado para obter a porcentagem da amostra e o número total de axônios em cada nervo está descrito a seguir:

$$(x) - \sum n^{\circ} \text{ de axônios do nervo} = 515$$

$$(y) - \sum \text{área dos campos} = 98392.87 \mu\text{m}^2$$

$$(z) - \sum \text{área do nervo} = 1196366.00 \mu\text{m}^2$$

Para a obtenção da porcentagem, aplicou-se a fórmula: $(y \times 100) / z$, ou seja, $(98392.87 \times 100) / 1196366 = 8,22\%$.

Para se obter o número total de axônios, aplica-se a fórmula: $(x \times 100)/\%$, ou seja, $(515 \times 100)/8,22 = 6265,2$.

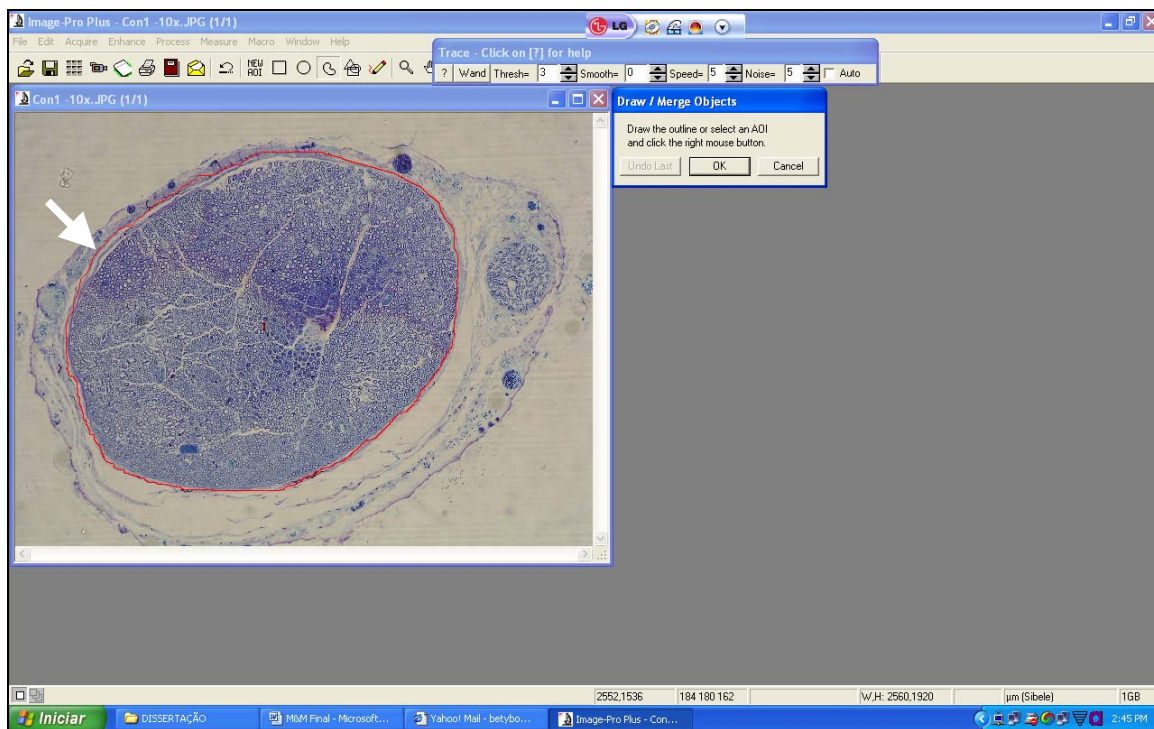


Figura 7: Tela do *software Image Pro Plus (Media Cybernetics®)* mostrando um corte transversal do nervo isquiático e o procedimento para medida da área do mesmo (seta). (Aumento = 100X).

4.4.2 Análise Morfométrica

Para a mensuração do diâmetro dos axônios e das fibras nervosas, da espessura das bainhas de mielina e determinação da razão G, utilizou-se um fotomicroscópio OLYMPUS BX 4.1, acoplado a uma câmera digital OLYMPUS COVER 018 – C-5050, 5.0 megapixel e analisador de imagens, que utiliza o *software Image-Pro Plus 4.5 – Media Cybernetics®*.

A calibração do sistema de análise de imagens para obtenção de medidas na unidade de micrômetros (μm) foi realizada com auxílio de uma lâmina de calibração micrometrada ZEISS 5_{+100/100} mm.

As medidas do diâmetro da fibra nervosa mielínica e do axônio foram obtidas de forma semi-automática (Figura 8). A partir desses dados foi feito o cálculo da espessura da bainha de mielina e da razão G.

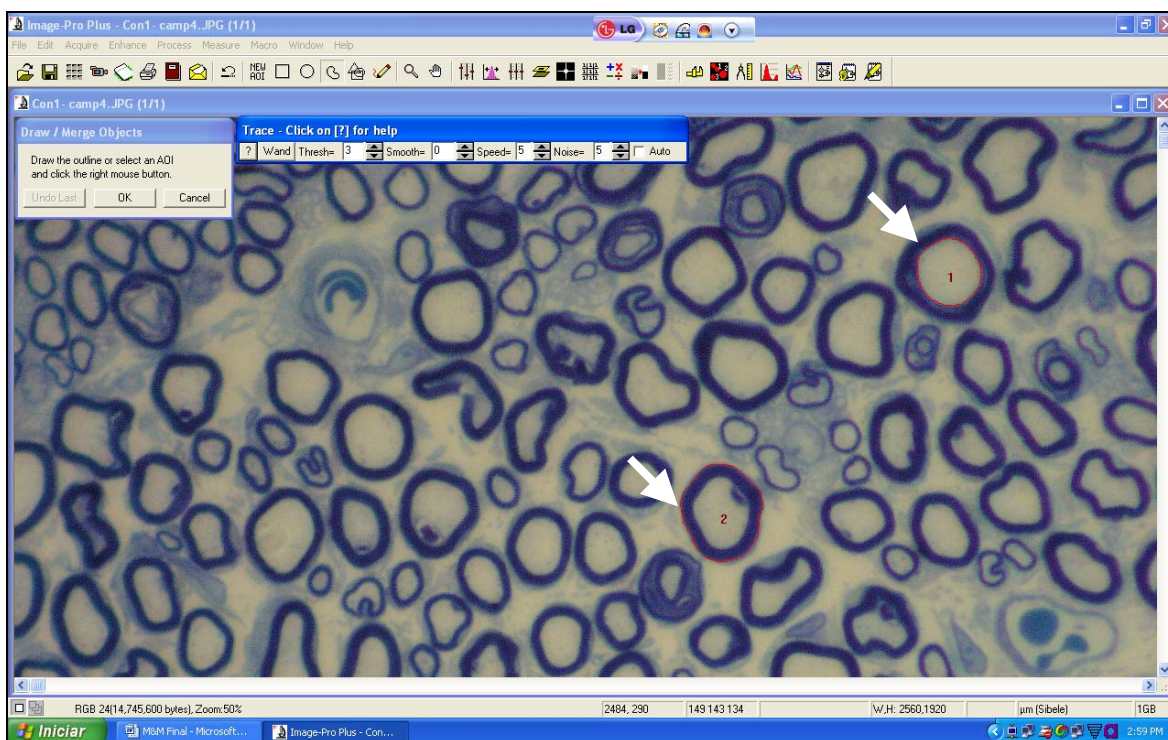


Figura 8: Tela do *software Image Pro Plus (Media Cybernetics®)*, utilizado para análise dos diâmetros dos axônios (1) e das fibras nervosas (2), em corte transversal do nervo isquiático (Aumento: 1000X).

Os valores obtidos através do *software* foram transferidos para o *Excel*, onde os dados foram processados.

Os valores da espessura das bainhas de mielina foram obtidos subtraindo-se o diâmetro do axônio do diâmetro da fibra, sendo o resultado dividido por dois. O valor da razão G foi calculado pela divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra. Os valores médios do diâmetro das fibras, assim como dos axônios, da espessura das bainhas de mielina e da razão G de cada

animal foram obtidos a partir da somatória dos valores, que foi dividida pelo número de axônios/fibras mensurados.

4.4.3 Análise Estatística

Para tratamento estatístico dos resultados foi utilizado o *software Bioestat*[®] 4.0. Para análise morfométrica, inicialmente realizou-se análise exploratória dos dados e, para avaliar a normalidade, aplicou-se o teste de *Shapiro Wilk*. Para a comparação inter-grupos aplicou-se os testes Anova (F) *One Way*, seguido do *post hoc* de *Tukey*. Devido à distribuição não normal dos dados, para a variável Razão G, aplicou-se o teste de *Kruskal Wallis*.

Para a análise funcional, a distribuição das amostras foi avaliada pelo teste de normalidade de *Shapiro Wilk*. Para a análise intra-grupos, utilizou-se o teste Anova (F) *Two Way*, seguido do *Post hoc* de *Tukey* e para a comparação inter-grupos aplicou-se o teste Anova (F) *One Way*, seguido do *post hoc* de *Tukey*.

A correlação entre os dados morfométricos e os parâmetros da análise funcional foi feita a partir do teste de correlação de *Pearson*.

5 RESULTADOS

A análise histológica dos cortes transversais do segmento distal do nervo isquiático realizada seis dias após lesão nervosa mostrou características morfológicas evidentemente distintas em relação ao nervo controle.

A mesma análise foi realizada após 24 dias da lesão nervosa nos grupos (CON, L, AAE, AAS, IAE e IAS). Verificou-se que os grupos experimentais apresentaram características morfológicas semelhantes entre si, sugerindo a presença de maior número de axônios com diâmetros proporcionalmente menores, além de proliferação de tecido perineural em relação ao controle. Entretanto, as características observadas no grupo IAE, foram as que mais se aproximaram do controle.

Todos os grupos experimentais apresentaram número de axônios elevado quando comparados ao grupo controle.

Verificou-se diâmetros axonais reduzidos em todos os grupos experimentais em relação ao controle. O mesmo ocorreu com o diâmetro das fibras nervosas, sendo que o grupo AAS apresentou valores reduzidos em relação ao IAE. A espessura da bainha de mielina foi menor em todos os grupos, sendo que no grupo AAS, também foi menor quando comparada com o IAE.

No que diz respeito à avaliação funcional, todos os grupos apresentaram características da impressão da pegada e valores de IFC que evidenciaram perda significativa da função ao 7º dia após lesão nervosa. Todavia, tanto as características da impressão das pegadas, quanto os valores que expressam a funcionalidade foram restabelecidos ao 21º dia PO.

A análise de correlação entre os parâmetros morfométricos e funcionais demonstrou não haver correlação significativa entre estas duas formas de avaliação.

5.1 Análise Morfológica do nervo após seis dias da lesão

A Figura 9A mostra o aspecto microscópico do nervo isquiático normal. Observa-se que seis dias após lesão por esmagamento, não se evidenciam axônios íntegros, havendo degeneração axonal e retração das bainhas de mielina, além da existência de atividade fagocitária, representada pela presença de macrófagos (Figura 9B).

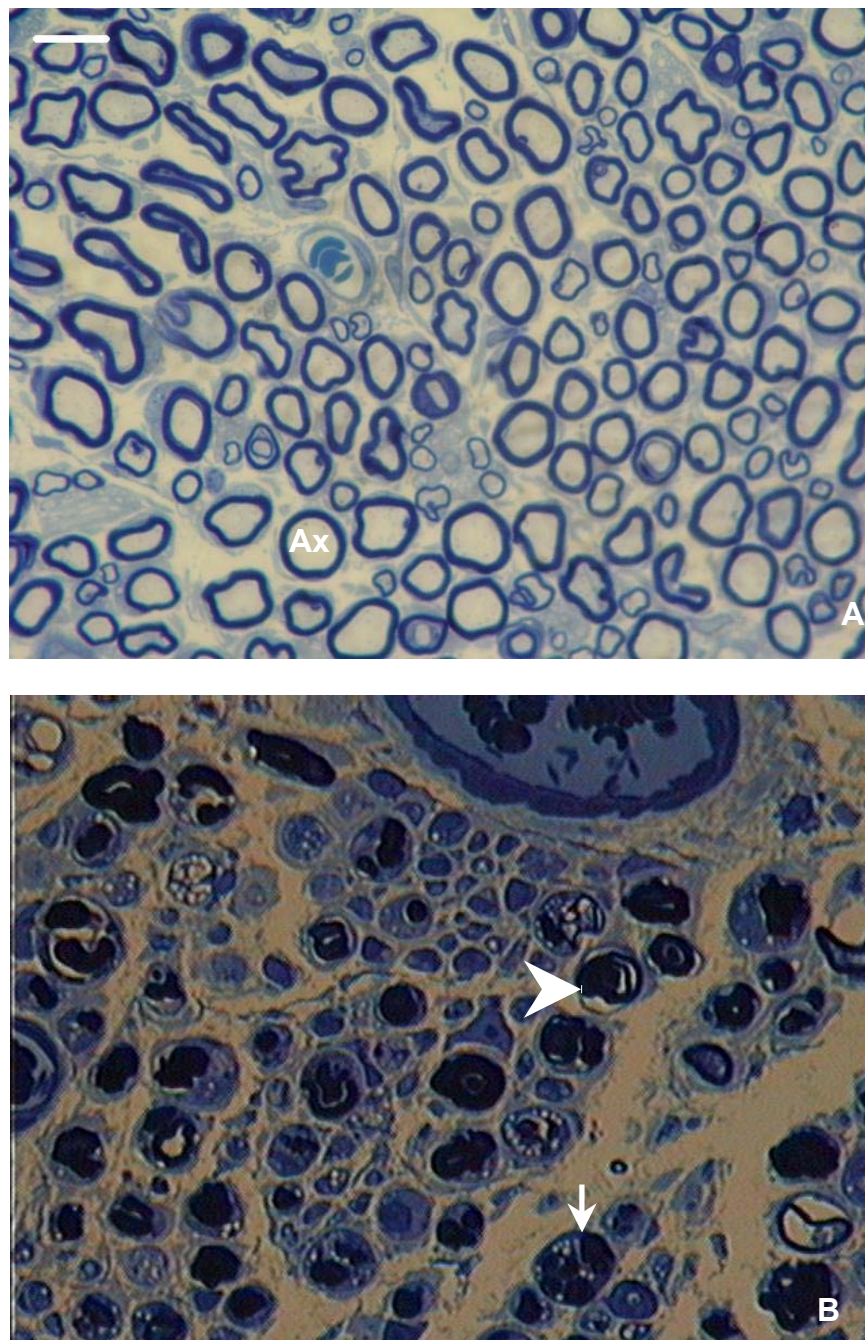


Figura 9: Fotomicrografia em corte transversal do nervo isquiático no grupo controle (A) mostrando características morfológicas do nervo normal; e seis dias após a lesão (B) mostrando degeneração axonal (cabeça de seta) e presença de macrófago (seta). Barra= 10 μ m.

5.2 Análise morfológica do nervo após 24 dias de lesão

A Figura 10A representa o aspecto morfológico do nervo normal, mostrando fibras menores mielinizadas com calibres variáveis, contorno regular, bainhas de mielina íntegras e com espessura proporcional ao diâmetro dos respectivos axônios. Em todos os grupos desnervados observam-se axônios com diâmetros e espessuras de bainha de mielina aparentemente menores, sendo mais evidente a presença de tecido perineural (Figuras 10B-F). Em análise qualitativa, os nervos regenerados nos animais mantidos agrupados (10C) em ambiente enriquecido e nos animais que permaneceram agrupados (10D) ou isolados em ambiente simples (10F) apresentaram características estruturais mais semelhantes ao grupo lesão. Entretanto, o grupo em que os animais foram mantidos isolados em ambiente enriquecido (10E) apresentaram características semelhantes ao controle.

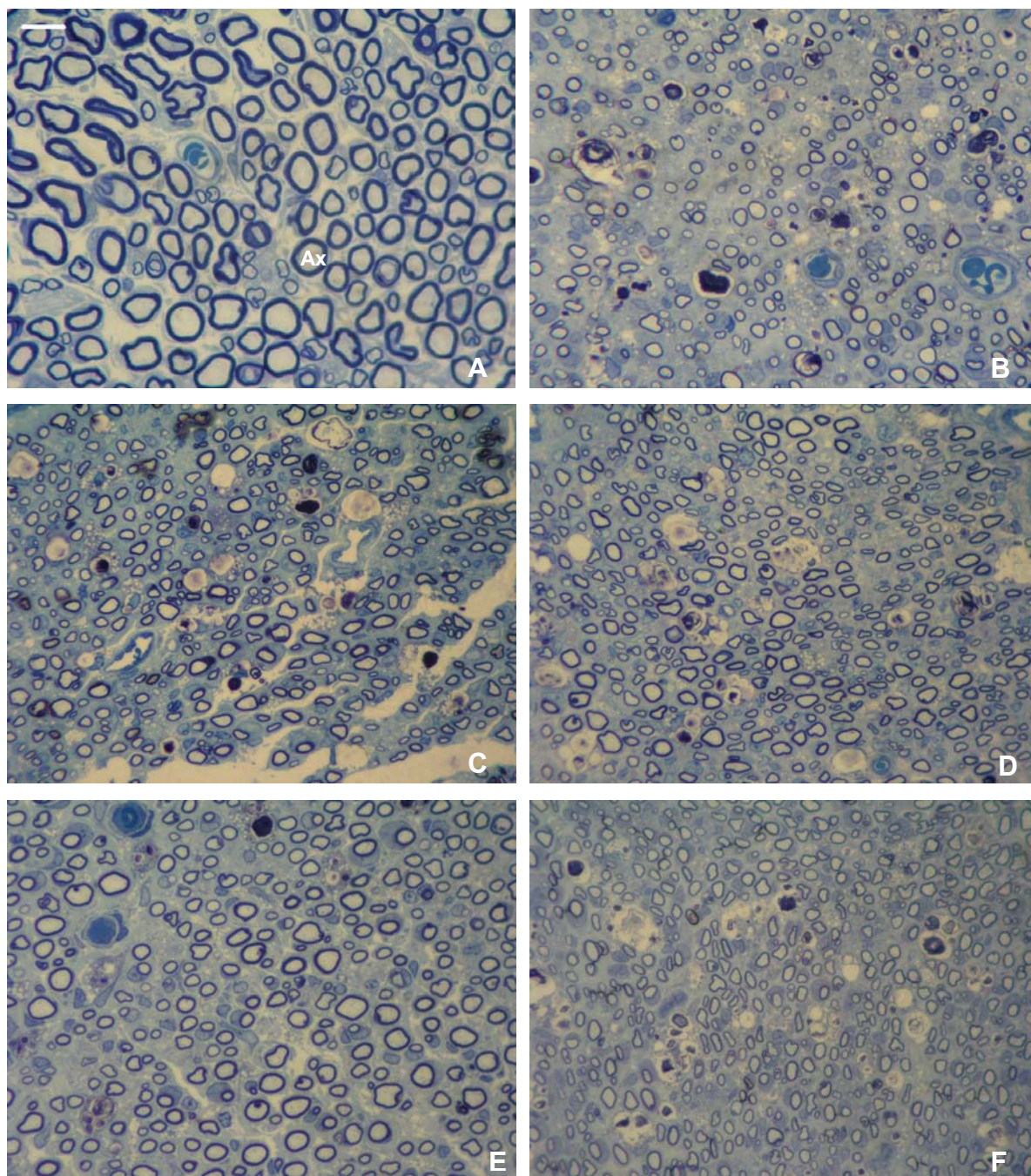


Figura 10: Micrografia em corte transversal do nervo isquiático nos grupos: Controle (A); Lesão (B); Agrupado Ambiente Enriquecido (C); Agrupado Ambiente Simples (D); Isolado Ambiente Enriquecido (E) e Isolado Ambiente Simples (F). Observar diferenças nos calibres dos axônios (Ax). Na espessura da bainha de mielina, bem como na distribuição do tecido perineural. Coloração: Azul de Toluidina; Barra = 10 μ m.

5.3 Número de axônios nos diferentes grupos experimentais

O número de axônios nos grupos AAE (19202,38 \pm 6579,22), AAS (27763,27 \pm 4925,29), IAE (17914,25 \pm 2806,35) e IAS (23424,98 \pm 3902,10) foi superior ao CON (12910,05 \pm 1677,18). O grupo AAS também apresentou número de axônios superior ao grupo L (18180 \pm 4484,19) IAE e AAE. (Figura 11; $p < 0,05$).

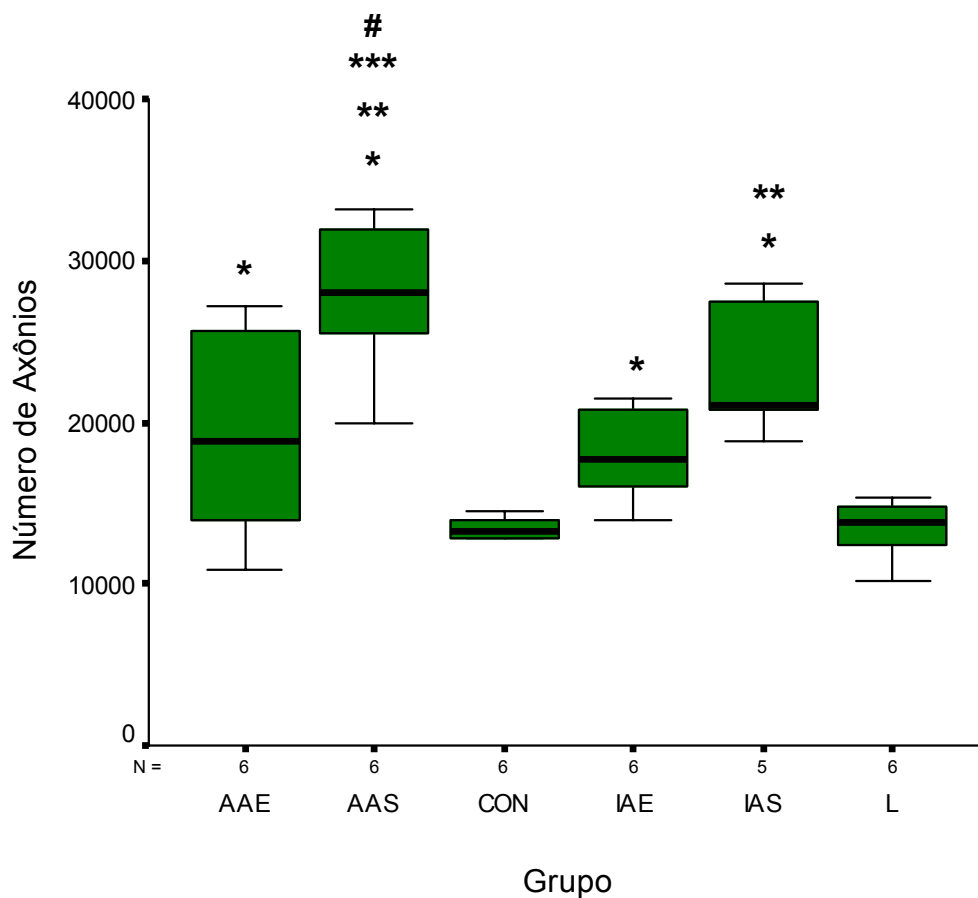


Figura 11: Valores medianos e diferença interquartílica do número de axônios dos grupos L, AAE, AAS, IAE e IAS e o CON. (*) Difere do CON; (**) Difere do L; (***) Difere do IAE; (#) Difere do AAE ($p < 0,05$).

5.4 Análise Morfométrica

O diâmetro dos axônios nos grupos L ($3,46 \pm 0,64$), AAE ($3,63 \pm 0,73$), AAS ($3,13 \pm 0,39$), IAE ($3,98 \pm 0,51$) e IAS ($3,62 \pm 0,54$) foi inferior ao do grupo CON ($5,75 \pm 0,26$); (Figura 12; $p < 0,05$).

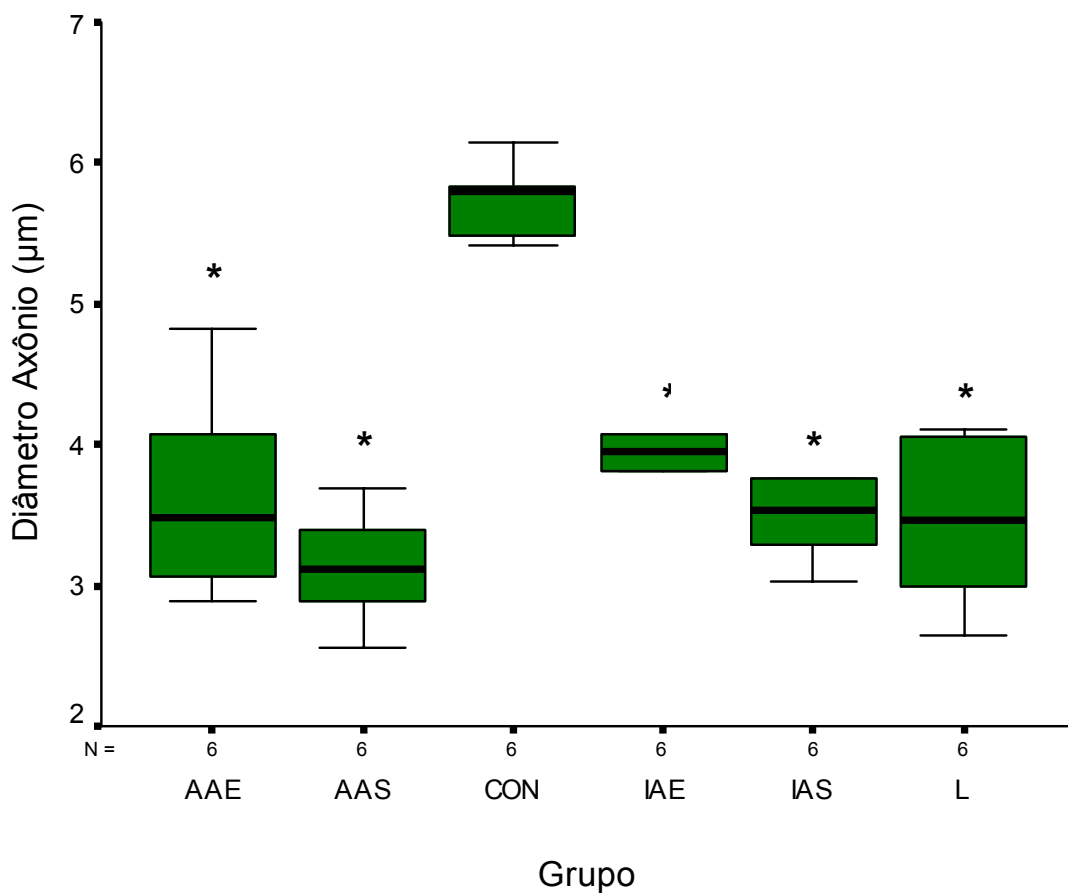


Figura 12: Valores medianos e diferença interquartilica do diâmetro dos axônios entre os grupos experimentais e Controle. (*) Difere do Controle (CON); ($p < 0,05$).

O diâmetro das fibras nervosas nos grupos L ($5,86 \pm 0,48$), AAE ($5,77 \pm 1,03$), AAS ($4,78 \pm 0,40$), IAE ($6,12 \pm 0,61$) e IAS ($5,44 \pm 0,63$) diferiu do CON ($9,26 \pm 0,29$). O grupo IAE apresentou diâmetro de fibra maior que o grupo AAS ($p < 0,05$; Figura 13).

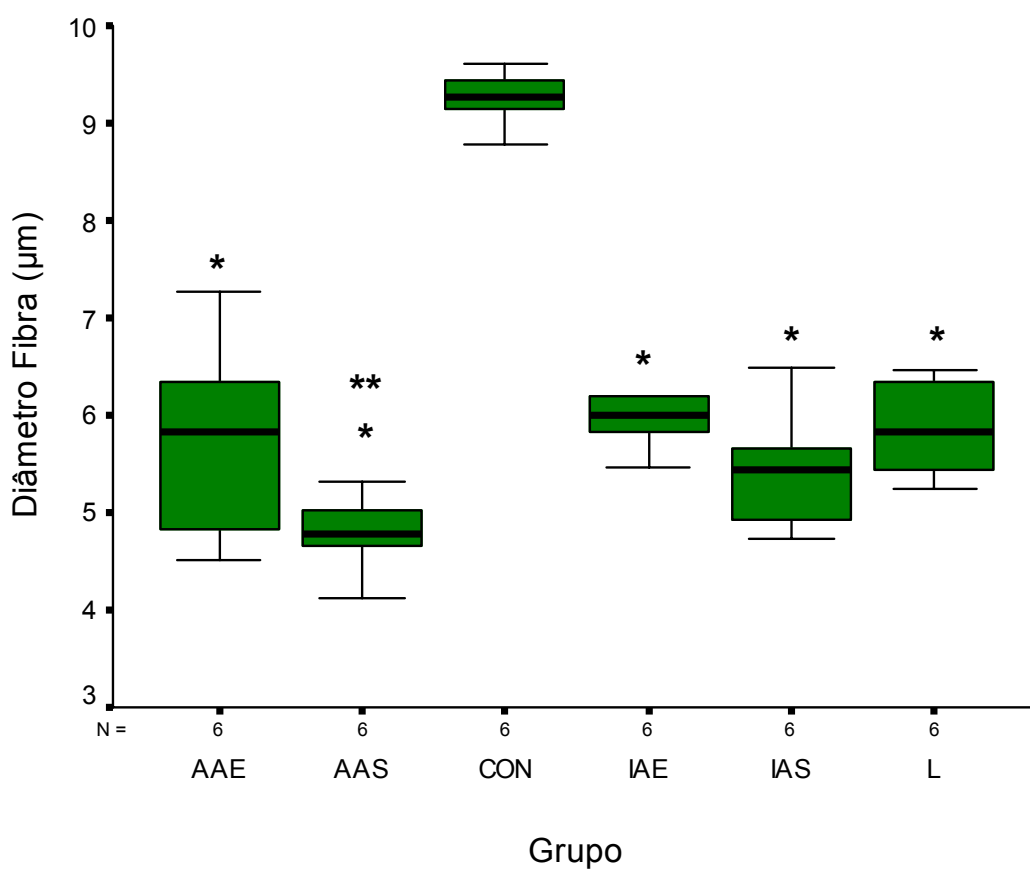


Figura 13: Valores medianos e diferença interquartílica do diâmetro da fibra nervosa entre os grupos experimentais e CON. (*) Difere do CON; (**) Difere do IAE ($p < 0,05$).

A espessura da bainha de mielina nos grupos L ($1,20 \pm 0,22$), AAE ($1,07 \pm 0,19$), AAS ($0,83 \pm 0,03$), IAE ($1,07 \pm 0,08$) e IAS ($0,91 \pm 0,07$) foi menor que no grupo CON ($1,75 \pm 0,14$). No grupo AAS, os valores foram menores que nos grupos L e IAE. O mesmo ocorreu no grupo IAS quando comparado ao grupo L (Figura 14; $p < 0,05$).

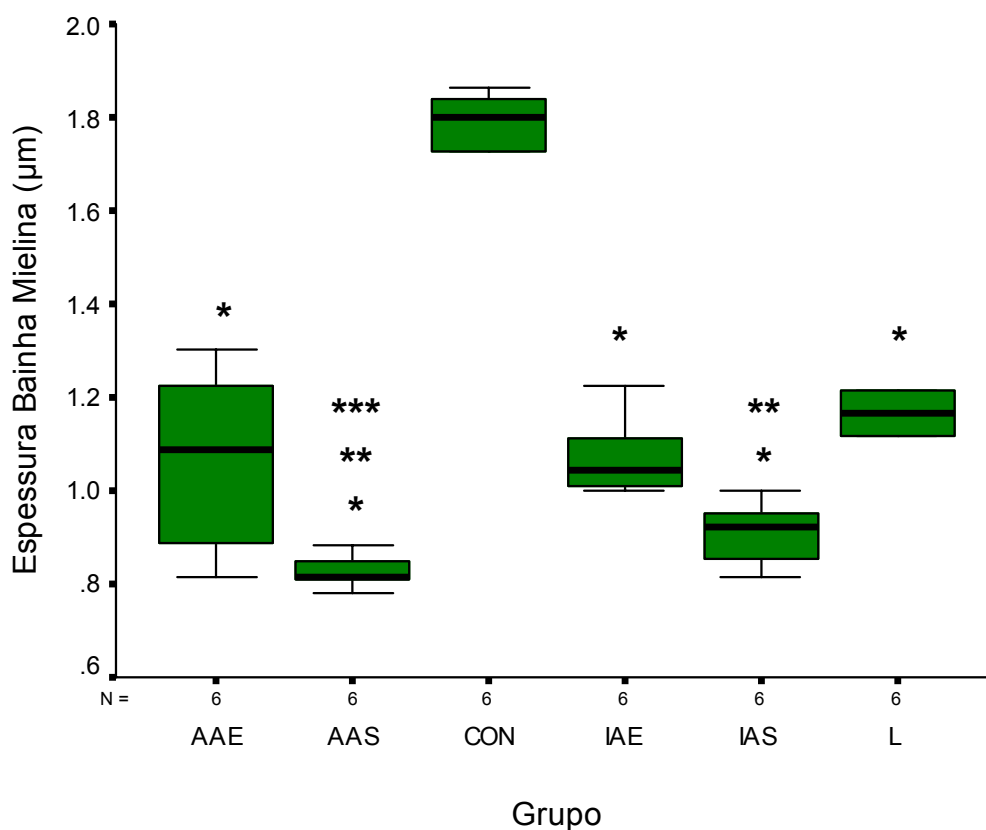


Figura 14: Valores medianos e diferença interquartílica da espessura da bainha de mielina entre os grupos experimentais e CON. (*) Difere do CON; (**) Difere do L; (***) Difere do IAE ($p < 0,05$).

A razão G nos grupos L ($0,60 \pm 0,23$), AAE ($0,63 \pm 0,09$), AAS ($0,64 \pm 0,07$), IAE ($0,64 \pm 0,08$), IAS ($0,65 \pm 0,07$) e CON ($0,62 \pm 0,22$) não diferiu entre os grupos (Figura 15; $p > 0,05$).

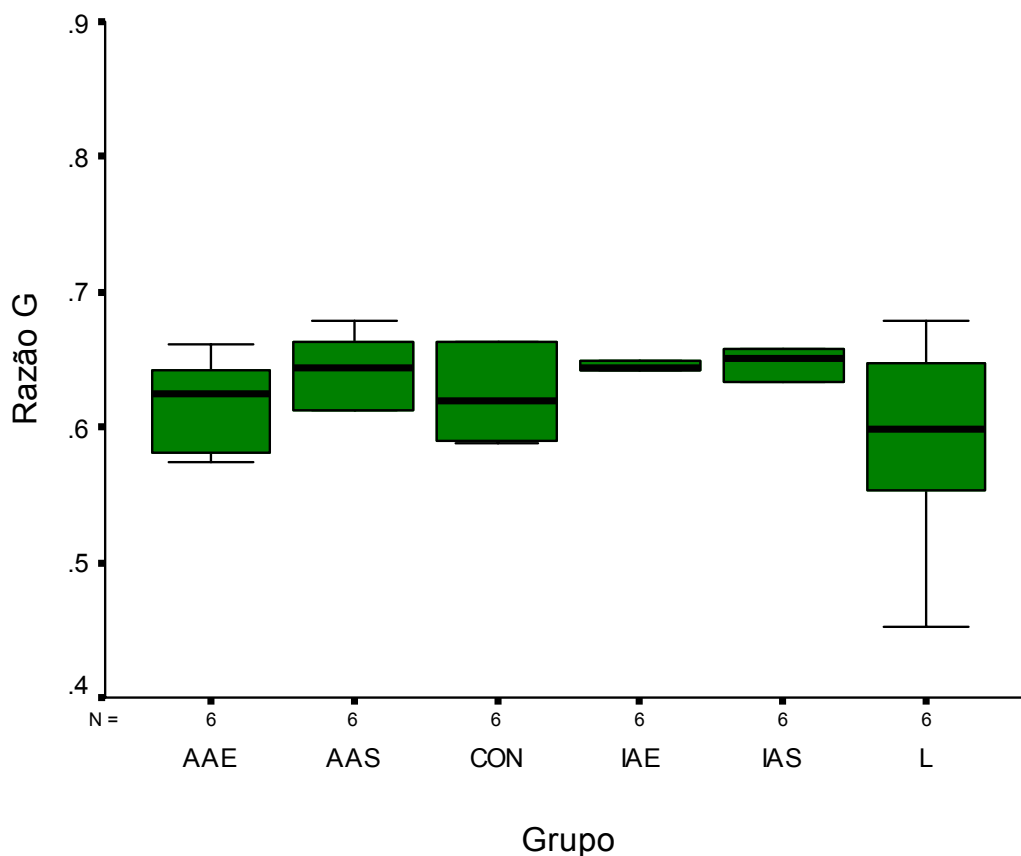


Figura 15: Valores medianos e diferença interquartílica da Razão G nos grupos: L, AAE, AAS, IAE, IAS e CON ($p > 0,05$).

5.5 Análise Funcional da Marcha

A Figura 16A mostra o padrão de marcha normal, apresentado pelo animal no período pré-operatório. No 7º dia PO (Figura 16B) é possível notar o aumento do comprimento da pegada (PL), assim como a diminuição da sua largura, devido à redução das distâncias entre os artelhos (TS e ITS). Essas características evidenciam perda completa da função sensório-motora.

Uma análise intra-grupos comparando a condição funcional pré-operatória (normal) e o 7º, 14º e 21º dias PO, mostrou uma redução significativa da funcionalidade para a marcha no 7º e 14º dias pós-operatório (PO) em todos os grupos experimentais, sendo que, ao 21º dia, a funcionalidade atingiu níveis semelhantes ao período pré-operatório ($p < 0,05$) (Figura 16C).

Aos 21 dias após lesão, os parâmetros que expressam a funcionalidade estão próximos às condições pré-operatórias, como observado na Figura 17.

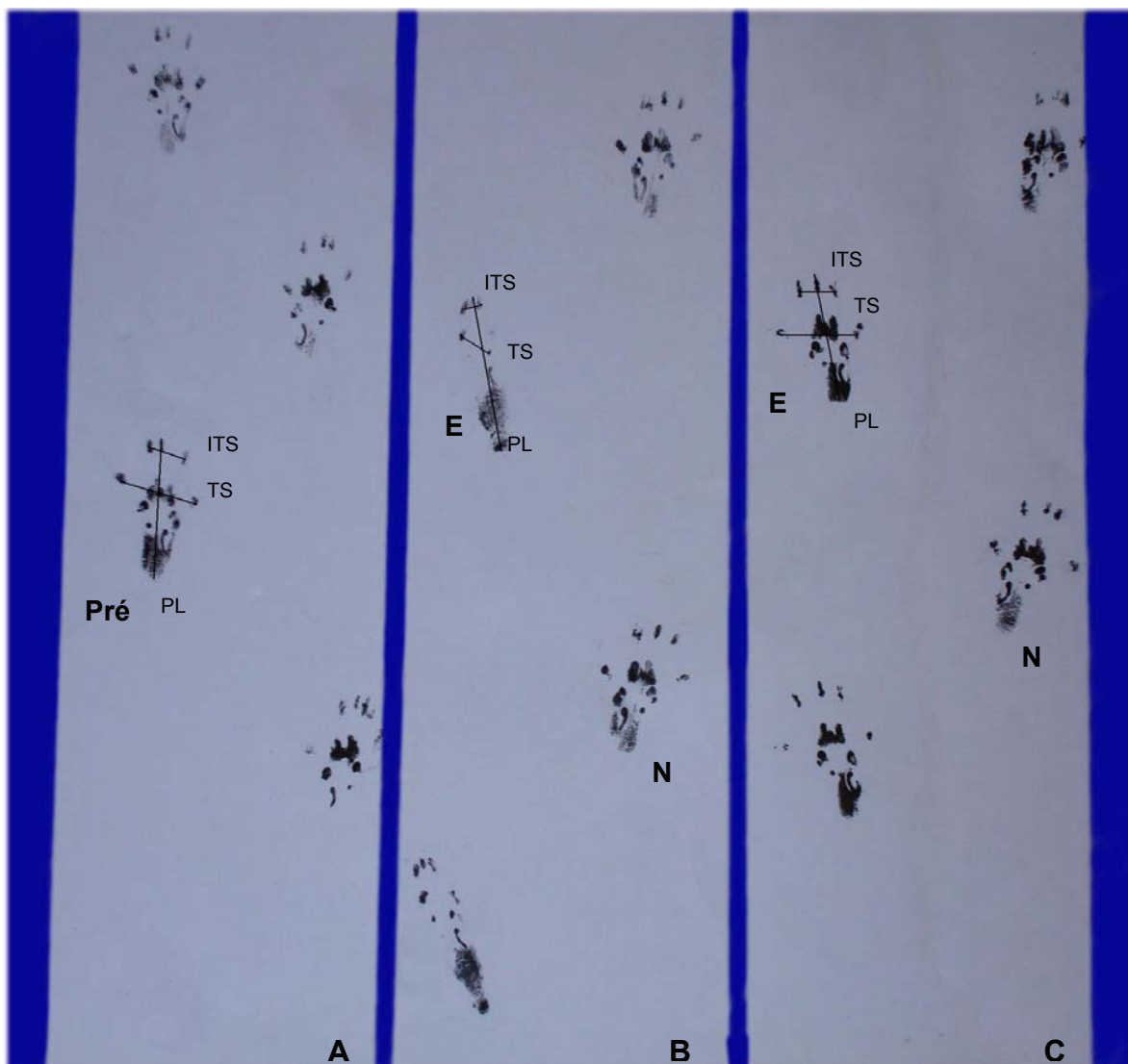


Figura 16: A impressão da pata normal (N) e experimental (E), no período pré-operatório (A), no 7º dia PO (B) e após 21 dias (C). Observar as variações nas distâncias (PL, IT, ITS), nos diferentes períodos de análise.

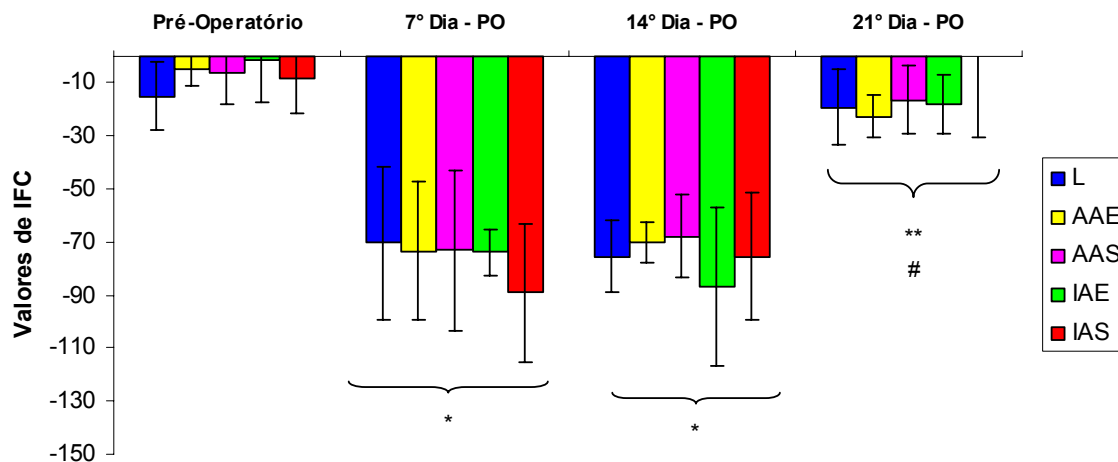


Figura 17: Valores médios \pm DP do Índice Funcional do Ciático (IFC), nos grupos experimentais e controle, nos intervalos de tempo avaliados. (*) Difere do pré-operatório; (**) Difere do 7º dia PO; (#) Difere do 14º dia PO; ($p < 0,05$).

Na análise inter-grupos não foi observada diferença entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados ($p > 0,05$).

5.6 Correlação entre os parâmetros morfométricos e funcionais

Ao correlacionar os dados do Índice Funcional do Ciático (IFC) e os parâmetros morfométricos (Tabela1), verificou-se a inexistência de correlação entre eles ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Correlação entre o IFC e os parâmetros morfométricos ($p > 0,05$).

	IFC	θ Axônio	θ Fibra	Esp. Mielina	Razão G
IFC	1				
θ Axônio	(r)=0,03 (p)=0,97	1			
θ Fibra	(r)=-0,27 (p)=0,66	(r)=0,86 (p)=0,06	1		
Esp.Mielina	(r)=-0,50 (p)=0,39	(r)=0,46 (p)=0,44	(r)=0,85 (p)=0,07	1	
Razão G	(r)=0,65 (p)=0,23	(r)=0,08 (p)=0,89	(r)=-0,43 (p)=0,47	(r)=-0.84 (p)=0,07	1

6 DISCUSSÃO

6.1 Animais experimentais e modelo de lesão nervosa

O emprego de animais em pesquisas experimentais é amplamente difundido, principalmente os de pequeno porte, devido ao seu menor custo de aquisição, manutenção e, sobretudo, viabilidade técnico-científica (Nascimento, 2005).

O rato foi escolhido como modelo para lesões nervosas periféricas por apresentar estrutura nervosa semelhante aos nervos periféricos humanos. O mesmo ocorre com os processos biológicos que envolvem a regeneração nervosa, entretanto em ratos, a regeneração é cerca de 4 vezes mais rápida que no homem (Gorio et al., 1983). Dessa maneira, a aplicação de diversos modelos experimentais de lesão torna possível o acompanhamento durante todos os estágios de recuperação.

A idade dos animais é outro fator importante a ser considerado. Animais jovens apresentam maior facilidade de regeneração e restabelecimento da função em relação a animais idosos (Verdú et al., 2000). Devido a essas características, para este estudo foram selecionados ratos adultos jovens, com idade entre seis e sete semanas.

Diversos modelos experimentais são empregados com o intuito de conhecer os fenômenos que envolvem os processos de degeneração e regeneração e a ampliação do conhecimento dos mecanismos de lesão nervosa permitiu investigações de interesse clínico (Santo Neto et al., 1998; Varejão et al., 2004).

O modelo de axoniotmese é amplamente utilizado para esse fim devido à preservação do endoneuro e da microcirculação, que favorecem a regeneração e a recuperação funcional (Varejão et al., 2001; Wolthers et al., 2005).

Dessa maneira, foram estabelecidos vários protocolos de lesão por esmagamento. Diversos dispositivos foram desenvolvidos para melhor padronizar o procedimento de lesão nervosa. Todos se mostraram eficientes para interromper temporariamente a passagem do impulso nervoso (Brigde et al., 1994; Marques, Silva, Santo Neto, 1996; Mazzer et al., 2006;).

Para investigar se o protocolo de esmagamento desenvolvido por Fernandes et al. (2005) e utilizado neste estudo foi eficiente para promover interrupção da passagem do impulso nervoso, foi estabelecido o grupo L6, onde se observou extensa degeneração axonal, demonstrando que, apesar da preservação dos envoltórios conjuntivos do nervo, não havia axônios íntegros para condução do impulso nervoso aos músculos.

Os demais grupos tiveram os segmentos distais do nervo isquiático analisados após 24 dias da lesão, considerando que entre 21 e 25 dias quase todas as fibras musculares estão reinervadas (Carmignoto et al., 1983; Gorio et al., 1983), indicando que os axônios já atravessaram o local do esmagamento, direcionando-se ao músculo, e que a recuperação funcional teria sido atingida.

6.2 Regeneração e maturação do nervo periférico

Nenhum estudo relacionado à exposição ao ambiente enriquecido como fonte de estímulo à regeneração nervosa periférica foi encontrado na literatura. O ambiente modificado poderia favorecer a atividade voluntária, a

percepção tátil e proprioceptiva sem, no entanto, causar sobrecarga. A consideração desses fatores instigou a aplicação desse recurso como meio de promover a regeneração nervosa periférica e, conseqüentemente, prover melhores condições para o retorno à função.

O número de axônios regenerados foi maior em todos os grupos experimentais, o que é comum após desnervação, devido ao fato de cada axônio emitir de 2 a 3 neuritos que seguem pelo tubo endoneural em direção ao músculo (Toft, Fugleholm e Schmalbruch, 1988).

A presença de numerosos brotos axonais após a desnervação também é conseqüente à liberação de fatores de crescimento, secretados tanto pelas células de Schwann como pelo músculo (Molteni et al., 2004; Chen Yu e Strickland, 2007).

Em lesões por esmagamento do nervo isquiático de ratos, o número de axônios permanece elevado até o 26º dia, quando inicia o processo de eliminação sináptica (Gorio et al., 1983) e esse número tende a decrescer no segmento nervoso distal à lesão.

Portanto, o estímulo a que os animais estiveram expostos, independente do grupo a que pertenciam, possivelmente promoveu a liberação de fatores de crescimento que favoreceram o brotamento axonal. Do mesmo modo, o exercício voluntário pareceu não interferir na expressão de fatores como a N-CAM e o IGF, secretados pelos músculos desnervados (Lieber, 2002).

Há que se considerar que após 14 dias da lesão, 25% das fibras musculares já se encontram reinervadas e, do 21º ao 25º dia, ocorre o ponto máximo de poliinervação (Carmignoto et al., 1983), que é decorrente de elevadas concentrações de fatores tróficos produzidos tanto pelas células de Schwann

como pelo músculo. Quando ocorre o acoplamento do terminal nervoso com a junção neuromuscular, há redução na liberação desses fatores e aumento da produção de neurotransmissores. A partir de então, as sinapses em excesso são eliminadas até que as junções tornem-se monoinervadas, o que ocorre por volta de 60 dias após a lesão (Gorio et al., 1983). Durante este processo ocorre degeneração dos axônios no nervo, sugerindo que avaliações em período mais prolongado permitiriam observar menor número de axônios no nervo distal à lesão.

Entretanto, o elevado número de axônios observado no grupo AAS em relação ao AAE sugere que a gaiola simples, a qual era desprovida de artifícios que incrementassem a movimentação voluntária, beneficiou o brotamento axonal.

Herbinson, Jaweed e Ditunno (1974) defendem a necessidade de um período de repouso após a desnervação, antes do início do exercício físico, argumentando que antes do 14º dia após a lesão, o exercício poderia sobrecarregar unidades motoras muito pequenas. Porém eles se referem ao exercício induzido por treinamento diário (natação). Neste estudo, o exercício foi voluntário, diferindo do que é relatado na literatura.

Os dados obtidos não permitem concluir que os estímulos proporcionados pelo ambiente enriquecido tenham se configurado como fator de sobrecarga às unidades motoras pequenas na fase inicial da regeneração nervosa, havendo necessidade de uma avaliação mais sensível que permita comparar o exercício voluntário e o induzido por treinamentos.

A maior quantidade de brotos no grupo AAS em relação ao L pode estar relacionada ao número de animais por gaiola, que no grupo L foi de seis e no AAS foi de três. Isso sugere que o agrupamento em número de três animais

promove maior interação entre os animais, o que reflete positivamente no brotamento axonal (Varty et al., 2000).

A ausência de estudos que envolvam a regeneração nervosa periférica e utilizem parâmetros semelhantes limita a discussão dos resultados à luz da literatura.

Em relação à maturação axonal, os animais de todos os grupos experimentais apresentaram diâmetros de axônio e fibra nervosa reduzidos em relação ao grupo CON. Este fenômeno é freqüentemente observado quando ocorre desacoplamento do terminal nervoso com a fibra pós-sináptica e é considerado decorrente da própria falta de conexão nervosa durante o processo de regeneração, pelo aumento da proliferação de colágeno, retração endoneural e pelos efeitos tardios da desnervação no corpo celular (Anselin, Fink e Davey, 1997).

Bridge et al. (1994), ao analisaram o nervo isquiático de ratos 8 semanas após axoniotmese, também verificaram redução dos diâmetros axonais e da fibra nervosa.

Os valores de diâmetro do axônio e da fibra nervosa no grupo controle correspondem aos dados disponíveis na literatura, que apontam diâmetros axonais médios entre cinco e sete μm e diâmetro da fibra entre nove e doze μm (Teodori, 2000; Souza, 2005).

Quando comparados ao CON, a recuperação dos diâmetros dos axônios nos grupos AAE e IAE foi maior (63,13% e 69,22%, respectivamente) em relação aos demais grupos (L= 60,17%; IAS= 62,96%). No entanto, AAS foi o grupo que apresentou menor diâmetro do axônio em relação ao CON, tendo recuperado 54,43%. Algo semelhante ocorreu com a recuperação do diâmetro da

fibra nervosa, entretanto somente o grupo IAE (66,09%) apresentou valores mais próximos ao CON, quando comparado aos demais grupos: L (63,29%), AAE (62,31%), AAS (51,62%) e IAS (58,75%).

Estes resultados sugerem que os animais dispostos individualmente em ambiente enriquecido estiveram submetidos a um estímulo que favoreceu a recuperação dos diâmetros axonais e da fibra nervosa, que poderiam refletir positivamente na maturação nervosa se a análise fosse realizada em tempos mais prolongados.

Considerando que a maturação só se torna completa a partir da reconexão e eliminação sináptica (Carmignoto et al., 1983; Gorio et al., 1983), os valores reduzidos do diâmetro dos axônios podem estar relacionados ao momento em que a avaliação foi realizada (24 dias após a lesão). Entretanto, mesmo quando avaliados por períodos prolongados, verificou-se que após lesão nervosa esses valores alcançaram cerca de 75% dos valores normais (Verdú et al., 2000).

Em relação à espessura da bainha de mielina, os grupos experimentais obtiveram valores inferiores ao CON.

Em fibras nervosas maduras existe uma proporção entre o diâmetro do axônio e a espessura da bainha de mielina (Fraher, 1973). Esses valores encontram-se reduzidos até que o axônio regenerado entre em contato com o órgão-alvo e a transmissão da informação seja restabelecida. Mesmo assim, o diâmetro do axônio, da fibra nervosa e a espessura da bainha de mielina não retornam exatamente aos valores encontrados em nervos normais (Sanders e Young, 1946; Bridge et al., 1994; Fraher e Dockery, 1998; Wolthers et al., 2005).

Santo Neto et al. (2004), verificaram que 60 dias após secção do nervo isquiático de ratos, seguida por reparo utilizando enxerto de músculo adequadamente tratado, observaram valores reduzidos de espessura da bainha de mielina.

Quando comparada ao grupo CON, a espessura da bainha de mielina nos grupos experimentais foi inferior (L = 68, 57%; AAE = 61, 14%; AAS = 47, 42%; IAE = 61, 14% e IAS = 52%). Nos grupos enriquecidos os valores foram superiores em relação ao CON, quando comparados aos obtidos pelos animais mantidos em gaiolas simples.

A razão G é um parâmetro relacionado à velocidade de condução das fibras nervosas, que em condições normais apresentam valores entre 0,6 e 0,7. Ela é um importante indicador de alterações na mielinização. Valores acima de 0,7 apontam redução na mielinização, enquanto abaixo de 0,6 indicam a presença de bainha de mielina muito espessa. Ambas as situações são desfavoráveis para o retorno à função normal (Ansselin; Fink e Davey, 1997). Waxman e Bennet (1972) consideram normais valores de razão G entre 0,5 e 0,7.

No presente estudo, de maneira geral, os grupos apresentaram razão G dentro dos padrões de normalidade, sugerindo que a velocidade de condução nervosa do nervo regenerado foi restabelecida, independente do ambiente enriquecido.

Esses achados concordam com Wolthers et al. (2005), que investigaram a maturação de fibras submetidas à axoniotmese e neurotmese e verificaram que em lesões por esmagamento os valores de razão G estavam mais próximos ao normal que na neurotmese, reafirmando o ambiente propício à regeneração na axoniotmese.

Embora os valores relacionados aos diâmetros do axônio e da fibra nervosa e à espessura da bainha de mielina tenham sido superiores nos grupos enriquecidos, a exposição precoce ao ambiente enriquecido não influenciou a maturação nervosa, aos 24 dias após a lesão.

6.3 Avaliação funcional da marcha

O Índice Funcional do Ciático é um método amplamente utilizado para avaliar o retorno da função sensório-motora após lesão nervosa periférica. Os parâmetros envolvidos nesta análise apresentam relação direta com a função dos músculos que inervam a pata posterior do animal. Além disso, trata-se de um método confiável, devidamente validado e de fácil reprodução que mais se aproxima das condições clínicas de avaliação (De Medinaceli, Freed e Wyatt, 1982; Bain, Mackinnon e Hunter, 1989; Varejão et al., 2004).

O material empregado para a avaliação proporciona adequada impressão das pegadas, evitando distorções nas imagens provocadas por alguns métodos de avaliação funcional que utilizam revelação em papel fotográfico. Do mesmo modo, a tinta escolhida para impregnação das patas apresenta menor risco de intoxicação dos animais (Varejão 2001, 2003).

Neste estudo, devido a inexistência de lesão no período pré-operatório, todos os grupos apresentaram padrão funcional normal, com valores próximos a 0. Segundo Hare et al. (1990), valores que variam entre 0 e ± 20 são considerados normais, expressando uma função que indica integridade tanto das estruturas nervosas, quanto musculares.

Entre o 7º e o 14º dia PO, houve decréscimo importante na função da marcha nos animais de todos os grupos desnervados, quando os valores do IFC se aproximaram de 100, reafirmando a eficiência do protocolo de lesão nervosa utilizado, que promoveu interrupção da informação sensório-motora.

Segundo Van Meeteren et al. (1997), após lesão por esmagamento ocorre um decréscimo de cerca de 80% da função, o que indica que a lesão interrompeu de forma efetiva a passagem de informação através do nervo, neste estudo.

As alterações nas distâncias dos pontos de referência nas pegadas dos animais para avaliação da marcha refletem as alterações funcionais, provocadas pela desnervação. O comprimento da pegada (PL) torna-se notavelmente maior devido ao comprometimento dos músculos plantiflexores (Varejão et al., 2004). A redução na largura da pegada, refletido pelo padrão de adução, caracterizado pela diminuição das distâncias entre os artelhos, indicou comprometimento nervoso do ramo tibial (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982).

Essas mesmas características foram encontradas na impressão das pegadas nos animais de todos os grupos experimentais neste estudo. No 7º dia PO, observou-se um aumento da distância entre o calcâneo e o 3º dedo (PL), assim como a redução das distâncias entre os artelhos (TS e ITS).

A redução abrupta da função, observada sete dias após a lesão, se deve à inexistência de terminais nervosos inervando o músculo (Carmignoto et al., 1983). Nesse período, os processos de degeneração e regeneração ainda estão em franco desenvolvimento (Martinez e Canavarro, 2000).

A reinervação muscular ocorre somente a partir da segunda semana após a lesão. Nesse período as fibras mais superficiais do músculo já se

encontraram reinervadas. Ao estabelecer conexão com a junção neuromuscular, o neurito regenerado passa a ser um terminal nervoso, tornando-se uma estrutura altamente especializada que irá constituir a terminação pré-sináptica. Dentro de alguns dias o terminal nervoso é capaz de responder a estímulos, tornando-se mais resistente à fadiga (Carmignoto et al., 1983; Gorio et al., 1983).

Quando avaliados 21 dias após a lesão, todos os grupos desnervados apresentaram valores próximos aos do período pré-operatório, indicando completo restabelecimento da função sensório-motora. Outros estudos, ao avaliarem o retorno à função após quatro semanas (Hare et al., 1990; Wolthers et al., 2005) encontraram valores de IFC próximos ao normal. A partir desse período não foram verificadas diferenças funcionais quando analisados aos 150 dias.

Carmignoto et al. (1983) citam que aos 19 dias PO, o músculo já apresenta 52% da força de contração isométrica em relação à pata contralateral. Aos 25 dias, a força é restabelecida em 80% e considerada praticamente normal. Mesmo após a reinervação, o potencial de ação da junção neuromuscular ainda sofre pelas modificações do terminal nervoso. Somente após quarenta dias é que os padrões desses potenciais voltam ao normal. Os resultados deste estudo estão de acordo com os achados na literatura. No entanto, não foi encontrada diferença quando os grupos experimentais foram comparados entre si. Da mesma forma, De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982), ao analisar a recuperação funcional por meio do IFC, não encontraram diferença entre o grupo controle e um grupo que teve somente o nervo exposto, porém não sofreu lesão. Estes autores relatam que apesar das vantagens do método, a avaliação por meio do IFC não é sensível a fatores que não estão relacionados à regeneração nervosa, mas que acabam interferindo na análise.

O IFC é um método qualitativo eficiente de avaliação do retorno funcional após lesão. Porém, distingue padrões opostos de funcionalidade, ou seja, detecta extremos no desempenho da função (Kanaya et al., 1995). Como exemplo disso, pode ser citado o trabalho de Hare et al. (1990) que avaliaram lesões por secção e por esmagamento, por um período de cinquenta e duas semanas. Grande diferença foi observada logo após a lesão, em todos os grupos. A partir da 24ª semana, os grupos que sofreram esmagamento não apresentaram diferença em relação à 52ª semana, mas ao mesmo tempo seus valores não estavam dentro dos padrões de normalidade. Dessa maneira, o IFC é hábil em detectar grandes desvios de funcionalidade, o que não ocorre com diferenças sutis que surgem no período tardio de regeneração.

O índice funcional do ciático demonstrou que todos os grupos experimentais recuperaram a função sensório-motora perdida, após 21 dias da axoniotmese.

6.4 Correlação entre o IFC e os parâmetros morfométricos

O IFC é amplamente utilizado para avaliar o retorno funcional após lesão nervosa periférica, agregando componentes sensoriais e motores na sua análise (Varejão et al., 2004; Wolthers et al., 2005). Além disso, é um método não invasivo que mais se aproxima das condições clínicas de avaliação. Entretanto, os parâmetros morfométricos conseguem expressar de forma objetiva as alterações estruturais no nervo em regeneração. Na análise morfométrica são desconsiderados fatores decorrentes da imobilização pela desnervação, assim

como a adequada integração entre SNC e SNP (Kanaya, Firrell e Breidenbach, 1995).

Neste estudo foi investigada a existência de correlação entre os parâmetros morfométricos e funcionais usados para avaliar a regeneração e o restabelecimento da função motora. Verificou-se que alguns parâmetros morfométricos apresentaram níveis de correlação entre si, entretanto não significativos.

Wolthers et al. (2005) utilizaram diferentes formas de avaliação do nervo lesado por esmagamento e secção: eletrofisiologia, avaliação funcional da marcha e histomorfometria. Padrões distintos foram encontrados entre essas duas formas de lesão. Todavia, ao comparar os parâmetros envolvidos nessas formas de avaliação, nenhuma correlação foi encontrada.

Do mesmo modo, Munro, Macckinnon e Midha (1998), ao realizarem estudo eletrofisiológico, morfométrico e funcional, perceberam não existir correlação entre essas diferentes modalidades de avaliação. Apenas moderada relação foi obtida entre o IFC e o diâmetro do axônio e da fibra nervosa e entre o IFC e a espessura da bainha de mielina. Apesar disso, nenhuma delas foi significativa.

Neste estudo, observou-se correlação moderada entre o IFC e a espessura da bainha de mielina e entre o IFC e a razão G. Quanto aos parâmetros morfométricos, observou-se alta correlação entre o diâmetro do axônio e da fibra, entre o diâmetro da fibra e a espessura da bainha de mielina e entre esta e a razão G.

Monte- Raso, Barbieri e Mazzer (2006) ao investigar a existência de relação entre os parâmetros morfométricos, verificaram existir relação entre

alguns parâmetros, como entre o diâmetro da fibra e do axônio. Entretanto citam que nem sempre essa correlação é observada.

A razão da inexistência de correlação entre diversos métodos de avaliação sensório-motora pode ter ocorrido devido ao fato dessas duas formas de avaliação abordar diferentes aspectos da regeneração. Enquanto a análise morfométrica considera parâmetros estruturais dos axônios regenerados, a avaliação da marcha considera a habilidade dos músculos reinervados em executar uma atividade. O restabelecimento da função requer a integridade do nervo, dos músculos inervados por ele e da adequada comunicação entre sistema nervoso central e periférico. Além disso, nenhuma forma de avaliação é capaz de englobar todas as variáveis relacionadas à regeneração (Kanaya, Firrell e Breidenbach, 1995; Van Meeteren et al., 1997).

A maturação das fibras motoras e sensoriais, importante para aquisição da habilidade motora fina, pode ser expressada pela análise morfométrica. No entanto, o processo de maturação só se completa aos 90 dias nesse tipo de lesão, quando as estruturas nervosas encontram-se próximas aos padrões normais.

Por outro lado, aos 21 dias após desnervação todas as fibras musculares encontram-se reinervadas, conferindo função à musculatura. O restabelecimento da função da pata desnervada é ilustrado pelas características normais da pegada, assim como por valores de IFC que expressam a funcionalidade do membro. Apesar da eficiência do IFC, não é possível detectar a aquisição de habilidade motora fina que ocorre ao longo do tempo.

Considerando esses fatores, sugere-se que a inexistência de correlação entre o IFC e os parâmetros morfométricos possa ser decorrente dos

distintos aspectos abordados por essas duas formas de avaliação. Além disso, a diferença temporal existente entre o final do período de maturação axonal, que ocorre aos 90 dias, e a reinervação observada aos 21 dias, pode ter contribuído para que não fosse verificada correlação entre os parâmetros funcionais e morfométricos.

6.5 Exposição ao ambiente enriquecido

As pesquisas relacionadas à recuperação da lesão nervosa periférica envolvem a aplicação de recursos direcionados ao nervo proximal à lesão e ao órgão-alvo. Dentre eles estão procedimentos que visam favorecer a regeneração nervosa (Santo Neto et al., 1998, 2004) e manutenção das propriedades contráteis do músculo como a eletroestimulação e diversas modalidades de exercício físico (Eberstein e Eberstein, 1996; Tam et al., 2001; Love, Son e Thompson, 2002; Gordon e Tam, 2003; Gordon, Sulamain e Boyd, 2003).

Entretanto, o retorno funcional requer, além da integridade nervosa e muscular, a integração adequada entre SNC e a periferia. Além disso, deve ser considerado que alterações na periferia desencadeiam repercussões centrais, e vice-versa. As partes do corpo são representadas no SNC pelos mapas corticais, os quais sofrem alterações quando algum segmento do corpo é lesado (Ziemann, Corwell e Cohen, 1998; Lundborg, 2003).

A plasticidade no SNC adulto pode envolver diversas modificações corticais. Dentre elas estão o estabelecimento de novas conexões, alteração na representação dos mapas corticais, assim como modificações estruturais e funcionais das células nervosas. Essas alterações visam criar mecanismos de

adaptação que minimizem as repercussões, tanto de lesões centrais quanto periféricas (Karl et al., 2001; Miana-Mena et al., 2002).

Geralmente, esses mecanismos compensatórios visam adaptar o organismo às novas condições. Um exemplo desse mecanismo compensatório é o aumento da área de representação cortical relacionada ao tato em detrimento da região correspondente à visão em indivíduos cegos (Melzer et al., 2001; Neville e Bavelier, 2002). Entretanto, nem sempre as adaptações são benéficas, como é o caso da dor e sensação fantasma que podem surgir após amputação ou desnervação de um segmento corporal (Karl et al., 2001; Roux et al., 2003; Koppelstaetter et al., 2007). Nesse caso, foi verificado aumento significativo das áreas corticais correspondentes ao membro afetado, ocasionando hipersensibilidade mesmo após ausência do membro.

Tendo em vista a suscetibilidade do SNC em reestruturar-se frente a modificações periféricas, é importante encontrar estratégias que viabilizem a adequada modulação da reorganização cortical (Ziemann et al., 2001; Kaelin-Lang, Sawaki e Cohen, 2004).

Com esse intuito, o ambiente enriquecido vem sendo empregado em diversos modelos de lesão do SNC (Passineau, Green e Dietrich, 2001; Barnea, Mishal e Nottebohm, 2006; Steiner et al., 2006), pois é uma forma de estímulo que favorece a locomoção, a exploração e a aquisição de novas habilidades, importantes na reorganização celular após lesão (Johansson, 2000; Will et al., 2002).

Desse modo, o exercício voluntário estimulado precocemente por meio de estímulos ambientais poderia ter papel importante na modulação central após lesão nervosa periférica. Alguns trabalhos (Classen et al., 1998; Bonato et al.,

2002), sugerem que movimentos voluntários simples e repetitivos de um segmento corporal são capazes de promover alterações na modulação da excitabilidade do córtex motor.

Considerando que a deterioração de receptores musculares e cutâneos é proporcional ao período de ausência de atividade sensório-motora (Lee e Wolfe, 2000), a estimulação precoce promovida por ambientes modificados poderia fornecer estímulos favoráveis à preservação desses receptores, acelerando a recuperação funcional após a regeneração do nervo.

No estudo de Varty et al., (2000), a locomoção, o comportamento exploratório e a habituação pareceram ser influenciados por modificações ambientais. Quando os animais foram alocados separadamente ou em grupo de 3 em gaiolas enriquecidas e padrão, tiveram seu comportamento alterado. Verificou-se que animais mantidos isolados em ambiente simples apresentaram maior taxa de exploração e locomoção. Em relação à habituação, que se refere à redução na resposta frente a estímulos ambientais, o mesmo não ocorreu. Entretanto, animais que foram agrupados em ambiente enriquecido tiveram redução na locomoção, no comportamento exploratório, assim como na habituação.

Biernaski e Corbett (2001) verificaram que animais sem lesões centrais dispostos em ambientes enriquecidos, apesar de apresentarem maior habituação aos estímulos e conseqüente redução da exploração, foram capazes de realizar tarefas mais rapidamente que os demais, alocados em ambiente padrão.

Neste estudo, para evitar ou minimizar os efeitos da habituação e garantir uma quantidade mínima de atividade voluntária, os compartimentos de água e ração tiveram sua disposição aleatoriamente alternada a cada dia.

Com o objetivo de promover a regeneração nervosa periférica, e favorecer a recuperação funcional, diferentes modalidades de exercício induzido, como a corrida em esteira e a natação, foram empregadas (Marqueste et al., 2004; Byun et al., 2005; Seo et al., 2006). Elas mostraram-se importantes na manutenção das propriedades contráteis e do trofismo muscular após desnervação (Tanaka, Tsubaki e Tachino, 2005).

Em relação ao exercício voluntário, a maioria dos trabalhos envolve o confinamento dos animais em rodas de exercícios (Hutchinson et al., 2004), normalmente utilizando-se da privação de água para induzir o animal a andar na roda, mensurando a distância percorrida dentro dela. Esse modelo não expressa com fidedignidade a quantidade de exercício realizada, considerando que o animal deambula dentro e fora da roda. Além disso, tanto as condições de confinamento quanto treinamentos por períodos prolongados ou cargas excessivas expõem o animal a condições estressantes que podem interferir negativamente na regeneração nervosa periférica (Van Meeteren et al., 1997).

Takeda et al. (2006) avaliaram a locomoção em um grupo submetido à lesão nervosa e outro exposto somente ao procedimento cirúrgico, onde o nervo foi exposto, porém, não sofreu lesão. A locomoção pareceu não ser influenciada nem pela lesão nervosa, nem pelo procedimento cirúrgico. Mesmo após axoniotmese, o animal é capaz de se locomover, no entanto, de forma compensatória.

Neste estudo, não foram analisadas as alterações do SNC em resposta à lesão nervosa periférica. Entretanto considerou-se que o ambiente enriquecido, através dos estímulos oferecidos poderia, além de preservar os receptores musculares e cutâneos, favorecer a passagem de informações através do nervo

regenerado e facilitar as respostas neuromusculares que propiciam a recuperação funcional. A semelhança observada nos resultados do IFC nos diferentes grupos sugere que o estímulo o qual os animais dos grupos enriquecidos foram expostos não foi suficiente para promover tais respostas, havendo necessidade de investigar outras formas de estimulação.

Outro aspecto que merece destaque é a influência do ambiente enriquecido sobre a regeneração axonal. O estímulo provocado pelo ambiente enriquecido, apesar de não ter favorecido a regeneração axonal e a recuperação da função, também não as prejudicou, podendo ser considerada uma forma de estímulo que não causa sobrecarga aos animais.

É conhecido que os animais experimentais podem ser facilmente influenciados por condições, como diferentes padrões de luminosidade, ruídos e odores (Martinez, Garcia e Morato, 2005). Na tentativa de minimizar possíveis alterações comportamentais que pudessem repercutir na locomoção, os ambientes, tanto enriquecido quanto padrão, possuíam dimensões proporcionais ao número de animais alocados por gaiola. Além disso, os recursos disponíveis aos animais nas gaiolas enriquecidas pequenas e grandes eram equivalentes.

Do mesmo modo, o comportamento locomotor pode sofrer modificações decorrentes dos ciclos hormonais à que estão sujeitos os animais. Alguns modelos de avaliação comportamental apontam que o ciclo estral poderia influenciar na atividade motora de fêmeas (Gouveia Jr e Morato, 2002). Dessa maneira, optou-se por utilizar animais do gênero masculino, para evitar possíveis alterações que pudessem não estar relacionadas à exposição ao ambiente modificado.

7 CONCLUSÃO

O ambiente enriquecido não interferiu de forma negativa na regeneração e maturação axonal, entretanto não favoreceu esse processo.

Em relação à avaliação funcional, de maneira geral, todos os grupos tiveram a função restabelecida, independentemente do número de animais por gaiola e dos estímulos a que estavam expostos.

Não foi verificada correlação entre os parâmetros morfométricos e funcionais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista que não foram encontrados registros do emprego de ambientes enriquecidos durante a regeneração nervosa periférica, muitas questões ainda precisam ser melhor investigadas.

Grande parte dos trabalhos que utilizam o exercício voluntário, o realizam por meio do confinamento do animal em rodas de exercícios. Devido à restrição a esses compartimentos, a mensuração das distâncias percorridas pelos animais é fidedigna. O mesmo não ocorre quando os animais são expostos a ambientes maiores, com artifícios que permitam que subam e desçam rampas e escadas. O conhecimento sobre a quantidade de exercício realizada poderia sugerir que os resultados obtidos nos grupos enriquecidos seriam proporcionais ao aumento da atividade voluntária.

Um aspecto importante a ser considerado diz respeito à associação entre exercício voluntário e o aumento na liberação de fatores neurotróficos (Gómez-Pinilla et al., 2002; Molteni et al., 2004). É possível que a dosagem de neurotrofinas possa fornecer subsídios de que o ambiente enriquecido proporcione a liberação de fatores que favorecem o brotamento axonal e a regeneração.

Não foram encontrados relatos que o exercício voluntário pudesse prejudicar o processo de regeneração. Ao mesmo tempo, o exercício voluntário nos músculos proximais à lesão, que compensam a função da musculatura desnervada, poderia auxiliar no retorno à função após reinervação (Gómez-Pinilla et al., 2002). Assim, a análise das características estruturais das junções neuromusculares e demais componentes dos músculos reinervados poderia

identificar as diferenças nas alterações decorrentes entre o exercício voluntário e induzido.

Van Meeteren et al. (1997) associa alguns protocolos de exercício ao aumento do estresse crônico em ratos. A liberação de substâncias produzidas devido ao aumento do estresse poderia promover um atraso na regeneração nervosa. Por conseguinte, sugere-se a identificação e dosagem dessas substâncias que poderiam prejudicar a regeneração, assim como em que condições de treinamento elas seriam produzidas.

Outra questão a ser melhor analisada seria o uso de sinais eletrofisiológicos para detectar diferenças na velocidade de condução. Essas informações, agregadas às análises funcionais, serviriam para uma melhor compreensão sobre o retorno à função analisada por meio do IFC.

Além disso, outras variáveis poderiam ser analisadas, como a exposição de animais mais jovens e idosos ao ambiente enriquecido, assim como distinto número de animais por gaiola e o emprego de outros estímulos ambientais.

Gorio et al. (1983), relata que a reinervação muscular inicia aos 14 dias após lesão. Dessa maneira, se faz necessária a investigação em tempos prolongados à exposição ao ambiente enriquecido, de modo a conhecer as repercussões da estimulação sensório-motora precoce, sobre as fibras motoras, proprioceptivas e táteis.

Tendo em vista a ausência de estudos utilizando ambientes modificados no tratamento de lesões nervosas periféricas, alguns dispositivos necessitam de adaptações visando facilitar a padronização do ambiente. Uma limitação deste estudo foi a diferença no assoalho das gaiolas enriquecidas

grande e pequena. Em virtude de as gaiolas enriquecidas serem comercializadas em material e formato padrão, nas gaiolas pequenas, a superfície de apoio dos animais era revestida por maravalha, enquanto nas grandes, uma tela de metal ficava disposta sobre a maravalha, o que pode ter modificado as informações táteis e proprioceptivas.

Os resultados deste trabalho proporcionam uma reflexão acerca da importância do emprego de novos estímulos que visem favorecer novas experiências sensoriais e motoras que possam contribuir para a regeneração nervosa periférica.

REFERÊNCIAS*

Anselin AD, Fink T, Davey DF. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with Schwann cells. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997; 23: 387-398.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter RT. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconst Surg.* 1989; 83: 129-138.

Barnea A, Mishal A, Nottebohm F. Social and spatial changes induce multiple survival regimes for new neurons in two regions of the adult brain: Anatomical representation of time? *Behav Brain Res.* 2005; 167: 63-74.

Bear MF, Connors BW e Paradiso MA. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso.* 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. 855p.

Bez LG, Val RC, Bastianetto C, Oliveira TF, Avelar CEM, Veloso DS, Costa JP, Oliveira FS. Persistência da artéria isquiática: relato de caso. *J Vasc Bras.* 2006; 5(3): 233-236.

Biernaskie J, Corbett D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci.* 2001; 21(14): 5272-5280.

Bonato C, Zanette G, Fiaschi A, Rossini PM. Activity-dependent modulation of synaptic transmission in the intact human motor cortex revealed with transcranial magnetic stimulation. *Cereb Cortex.* 2002; 12(10): 1057-1062.

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

Bridge PM, Ball DJB, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl A. Nerve crush injuries – a model of axonotmesis. *Exp Neurol*. 1994; 127: 284-290.

Bronikowski AM, Carter PA, Swallow JG, Girard IA, Rhodes JS, Garland T. Open-field behavior of house mice selectively bred for voluntary wheel-reunning. *Behav Genet*. 2001; 31 (3): 309-315.

Burghardt PR, Fulk LJ, Hand GA, Wilson MA. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res*. 2004; 1019: 84-96.

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

Byun YH, Lee MH, Kim H, Chang HK, Lee TH, Jang MH, Shin MC, Shin MS, Kim CJ. 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: 222-228.

Canto RST, Bueno RJN, Pereira WB. Luxação posterior traumática do quadril. *Rev Bras Ortop*. 1993; 28 (10): 779-784.

Carmignoto G, Finesso M, Siliprandi R, Gorio A. Muscle reinnervation – I. Restoration of transmitter release mechanisms. *Neurosci*. 1983; 8(3): 392- 401.

Carrol P, Lewin G, Koltzenburg M, Toyka KV, Thoenen H. A role for BDNF in mechanosensation. *Nat Neurosci*. 1998; (1): 42- 46.

Causing CG, Gloster A, Aloyz R, Bamji SX, Chang E, Fawcett J, Kuchel G, Müller FD. Synaptic innervation density is regulated by BDNF. 1997; *Neuron* 18: 257-267.

Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Ann Rev Neurosci.* 2007; 30: 209-233.

Classen J, Liepert J, Wise SP, Hallet M, Cohen LG. Rapid plasticity of human cortical movement representation induced by practice. *J Neurophysiol.* 1998; 79: 1117-1123.

Coelho TH, Fortunato JMS, Moreira AFL. Sinaptogênese: do cone de crescimento à sinapse neuromuscular. *Rev Port Psicoss.* 2001; 3(1): 95-121.

Dash H, Kononov A, Prayson RA, Petras S, Browe EZ. Evaluation of nerve recovery from minimal duration crush injury. *Ann Plastic Surg.* 1996; 37(5): 526-531.

De Medinacelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of the rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77: 634-643.

De Medinacelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. Rat sciatic functional index data management system with digitized input. *Comp Biom Res.* 1984; 17: 634-641.

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

Ferchmin PA, Bennett EL, Rosenzweig MR. Direct contact with enriched environment is required to alter cerebral weights in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1975; 88(1): 360-367.

Fernandes KCBG, Polacow MLO, Guirro RRJ, Campos GER, Somazz MC, Pinto VF et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após

desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisiot.* 2005; 9 (2): 235-241.

Ferreira AS. *Lesões nervosas periféricas: diagnóstico e tratamento.* 2 ed. São Paulo: Santos; 2006. 253p.

Finkbeiner S. Calcium regulation of the brain- derived neurotrophic factor gene. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57: 394-401.

Fraher JP. A quantitative study of anterior root fibres during early myelination. II. Longitudinal variation in sheath thickness and axon circumference. *J Anat.* 1973; 15(3): 421-444.

Gentile AM, Beheshti Z, Held JM. Enrichment versus exercise effects on motor impairments following cortical removals in rats. *Behav Neural Biol.* 1987; 47: 321-332.

Gómez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton V. Voluntary Exercise Induces a BDNF-Mediated Mechanism that Promotes Neuroplasticity. *J Neurophysiol.* 2002; 88: 2187-2195.

Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 2003; 8: 236-250.

Gorio A, Carmignoto G, Finesso M, Polato P, Nunzi MG. Muscle reinnervation II – Sprouting, synapse formation and repression. *Neurosci.* 1983; 8(3): 403-416.

Goss CM. *Gray anatomia.* 26 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988. 1147p.

Gouveia Jr A, Morato S. Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. *Int Psicol.* 2002; 6 (2): 141-148.

Graça DL, Bondan EF, Pereira LAVD, Fernandes CG, Maiorka PC. Behavior of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. *Arq Neuropsiquiatr.* 2001; 59 (2B): 358-361.

Guimarães GC, Machado MRF, Cruz C, Santos ALQ, Miglino MA, Cattelan JW. Morfologia microscópica do nervo radial do gato doméstico *Biosci. J.* 2006; 22(3): 127-137.

Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: A long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 89(2): 251-258.

Herbinson GJ, Jaweed MM, Ditunno JF. Effects of swimming on reinnervation of rat skeletal muscle. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1974; 37: 1247- 1251.

Hruska RE, Kennedy S, Silbergeld O. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci.* 1979; 25: 171-180.

Hutchinson KJ, Gómez-Pinilla F, Crowe MJ, Ying Z, Basso DM. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain.* 2004; 127: 1403-1414.

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

Jacques L, Kline DG. Response of the peripheral nerve to physical injury. *Neurosurg.* 2000; (1): 516-525.

Johansson CE, Palm DE, Primiano MJ, Mc Milan PN, Chan P, Knuckey et al. Choroid plexus recovery after transient forebrain ischemia: role of growth factors and other repair mechanisms. *Cell Mol Neurobiol.* 2000; 20(2): 197-216.

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

Kaeling-Lang A, Sawaki L, Cohen LG. Role of voluntary drive in encoding an elementary motor memory. *J Neurophysiol.* 2005; 93: 1099-1103.

Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic Functional Index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1996; 98(7): 1264-1271.

Karl A, Birbaumer N, Lutzenberger W, Cohen LG, Flor H. Reorganization of motor and somatosensory cortex in upper extremity amputees with phantom limb pain. *J Neurosci.* 2001 21(10): 3609-3618.

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

Kempermann G, Praag VH, Gage FH. Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. *Prog Brain Res.* 2002; 127(35): 35-48.

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

Koizumi MS. Padrão das lesões das vítimas de motocicleta. Rev Saúde Públ. 1992; 26 (5):306-315 .

Koppelstaetter f, Siedentopf CM, Rhomberg P, Lechner- Steinleitner S, Mottaghy FM, Eisner W, Golaszewski SM. Functional magnetic resonance imaging before motor cortex stimulation for phantom limb pain [abstract 17846735]. Nervenarzt. 2007; 78(9).

Kozlowski DA, James DC, Schallet T. Use dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions. J Neurosci. 1996; 16: 4776-4786.

Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. J Am Acad Orthop Surg. 2000; 8 (4): 243-252.

Lieber RL. Skeletal muscle structure and function: implications for rehabilitation and sports medicine. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2002. 369p.

Love FM, Son YJ, Thompson WJ. Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to synaptic sites. J Neurobiol. 2003; 54(4) 566-576.

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

Lundy-Ekman, L. Neurociência: Fundamentos para a reabilitação. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004; 654 p.

Macedo CAS, Galia CR, Rosito R, Perea CEF, Müller LM, Verzoni GG, Rodrigues CAK, Klein DR, Bremm LS. Abordagem cirúrgica na artroplastia total primária de quadril: antero-lateral ou posterior? Rev Bras Ortop. 2002; 37 (9): 387-391.

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: 1988-1985.

Marques MJ, Silva CF, Santo Neto H. An ultrastructural study of the temporal progress of neuromuscular junction regeneration after sciatic nerve transection and tubulization repair. *Braz J Morphol Sci*. 1996; 13(2): 181-187.

Martinez AMB, Ribeiro LCV. Ultrastructural localization of calcium in peripheral nerve fibers undergoing Wallerian degeneration: an oxalate pyroantimonate and X-ray microanalysis study. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1998; 30: 451-458.

Martinez AMB, Canavarro S. Early myelin breakdown following sural nerve crush: a freeze-fracture study. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33 (12) 1477-1482.

Martinez R, Garcia AMB, Morato S. Papel da luminosidade do biotério no comportamento do rato no labirinto em cruz elevado. *Estud Psicol*. 2005; 10 (2): 239- 245.

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.

Mello LR, Feltrin Y, Selbach R, Junior GM, Spautz C, Haas LJ. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001; 59(2): 372-379.

Meltzer LA, Yabaluri R, Deisseroth K. A role for circuit homeostasis in adult neurogenesis. *Trends Neurosci*. 2005; 28 (12) 653-660.

Melzer P, Morgan VL, Pickens DR, Price RR, Wall RS, Ebner FF. Cortical activation during Braille reading is influenced by early visual experience in subjects with severe visual disability: a correlation fMRI study. *Hum Brain Mapp.* 2001; 14(30): 186-195.

Miana-Mena FJ, Roux S, Benichou JC, Osta R, Brûlet P. Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(5): 3234-3239.

Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gómez-Pinilla F, Twiss JL. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *J Neurosci.* 2004; 101(22): 8473-8478.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N. Índice Funcional do Ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores. *Acta Ortop Bras.* 2006; 14(3): 133-136.

Müller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *Am J Pathol.* 2001; 159(6): 2187-2197.

Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1998; 21(8): 1095-1097.

Nascimento JEA. Fundamental Steps in experimental design for animal studies. *Acta Cir Bras.* 2005; 20 (1): 1-7.

Neville H, Bavallier D. Human brain plasticity: evidence from sensory deprivation and altered language experience. *Prog Brain Res.* 2002; 138: 177-188.

Oliveira CEN, Salina ME, Annunziatto NF. Fatores ambientais que influenciam a plasticidade do SNC. *Acta Fisiátrica*. 2001; 8(1): 6-13.

Pachioni CAS, Mazzer N, Barbieri CH, Fazan VPS, Padovani CR, Moro CA, Silva CAA. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. *Acta Ortop Bras*. 2006; 14(4): 203-207.

Pan HC, Cheng FC, Chen CJ, Lai SZ, Lee CW, Yang DY et al. Post injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clinical Neurosci*. 2007; 14: 1089- 1098.

Passineau MJ, Green EJ, Dietrich DW. Therapeutic effects of environmental enrichment on cognitive function and tissue integrity following severe traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol*. 2001; 168: 373-384.

Rempel D, Dahlin L, Lundborg G. Pathophysiology of nerve compression syndromes: response of peripheral nerves to loading. *J Bone Joint Surg Am*. 1999; 81:1600-10.

Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*. 2000; 23: 863-868.

Rosenzweig MR, Krech D, Bennet EL. Heredity, environment, brain biochemistry and learning. *Current Trends Psychol Theor*. 1961: 87-110.

Rosenzweig MR, Krech D, Bennet EL. Enriched environment: facts, factors, and fantasies In: Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training. *Progr Neurol*. 2004; 72: 167-182.

Reynolds JL, Urbanchek MS, Asato H, Kuson WM Jr. Deletion of individual muscles alters rat walking- track parameters. *J Reconstr Microsurg*. 1996; 12: 461-466.

Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci*. 2000; 97: 7657-7662.

Roux FE, Lotterie JÁ, Cassol E, Lazorthes Y, Sol JC, Berry I. Cortical areas involved in virtual movement of phantom limbs: comparison with normal subjects. *Neurosurg*. 2003; 53(6): 1342-1352.

Sanders FK, Young JZ. The influence of peripheral connexion on the diameter of regenerating nerve fibres. *J Exp Biol*. 1943; 203-217.

Segovia G, Yagüe AG, García-Verdugo JM, Mora F. Environment enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res Bull*. 2005: 1-7.

Smith GM, Rabinovsky ED, McManaman JL, Shine HD. Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury. *Exp Neurol*. 1993; 121: 239- 247.

Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*. 1999; 9: 313-325.

Steiner B, Winter C, Hosman K, Siebert E, Kempermann G, Petrus DS et al. Enriched environmental induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in 6-OHDA rat model of Parkinson`s disease. *Exp Neurol*. 2005; 199(2): 291-300.

Santo Neto H, Teodori RM, Somazz MC, Marques MJ. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. *Br J Plast Surg*. 1998; 51(7): 555-560.

Santo Neto H, Pertille A, Teodori RM, Somazz MC, Marques MJ. Primary nerve repair by muscle autografts prepared with local anaesthetic. *Microsurgery*. 2004; 24(3): 187-193.

Seo, T. B., et al. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. *J Amer Col Sports Med*. 2006; 38(7): 1267-1276.

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. Nerve and nerve injuries. 2nd Ed. Churchill Livingstone, London, 1985.

Tam SL, Archibald V, Jassar B, Tyreman N, Gordon T. Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. *J Neurosci*. 2001; 21(2): 654-667.

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: 221-234.

Tanaka, S; Tsubaki, A; Tachino, K. Effect of Exercise Training after Partial Denervation in Rat Soleus Muscles. *J. Phys. Ther. Sci*. 2005; 17: 97-101.

Takeda SYM, Oliveira LS, Sobral LL, Montebelo MIL, Teodori RM. Deslocamento voluntário e comportamento exploratório em ratos normais e desnervados. In: Anais do Intercobraf; 2006. Santos. v.3, p. 1.

Teodori, RM. Regeneração axonal após reparo nervoso com enxerto de músculo esquelético: Estudo morfométrico [tese]. Campinas: UNICAMP; 2000.

Toft PB, Fugleholm K, Scmalbruch H. Axonal branching following crush lesions of peripheral nerves of rat. *Muscle Nerve*. 1988; 11: 880-889.

Topp KS, Boyd BS. Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. *Phys Ther*. 2006; 86(10): 93-109.

Van Meeteren NLU, Brakee JH, Hamers FPT, Helders PJM, Croiset G, Gispen WH, Wiegant VM. Recovery of function after sciatic nerve crush lesion in rats selected for diverging locomotor activity in the open field. *Neurosci Lett*. 1997; 238: 131-134.

Van Meeteren NLU, Brakee JH, Hamers FPT, Helders PJM, Gispen WH. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil*. 1997; 78: 70-77.

Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA. Environmental enriched and isolation rearing in the rat: Effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry*. 2000; 47: 864-873.

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: 1-9.

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: 186-194.

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.

Ziemann U, Corwell B, Cohen LG. Modulation of plasticity in human motor cortex after forearm ischemic nerve block. *J Neurosci.* 1998; 18(3): 1115-1123.

Ziemann U, Muellbacher W, Hallett M e Cohen LG. Modulation of practice-dependent plasticity in human motor cortex. *Brain.* 2001; 124: 1171-1181.

Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training. *Progr Neurol.* 2004; 72: 167-182.

Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, Schmalbruch H, Krarup C. Comparative electrophysiological, functional, and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery.* 2005; 25(6): 508-519.

ANEXO



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

Parecer N°. 045/2007

Protocolo nº. 046/2007

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CCEA/UFSCar, durante sua 14ª. Reunião, concluiu a apreciação ética do projeto de pesquisa “Influência do exercício voluntário precoce por meio de exposição a ambiente enriquecido sobre a regeneração nervosa periférica”, elaborado por Rosana Macher Teodori. Projeto aprovado.

São Carlos, 3 de outubro de 2007.



Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

