

Denis Guilherme Guedert

**AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DO EXERCÍCIO FÍSICO
SOBRE A REGENERAÇÃO NERVOSA DE RATOS WISTAR
SUBMETIDOS A AXONOTMESE DO NERVO ISQUIÁTICO**

Dissertação submetida ao
Programa Multicêntrico de Pós-
graduação em ciências Fisiológicas
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Ciências
Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Edison
Sanfelice André.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Guilherme Guedert, Denis

AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A
REGENERAÇÃO NERVOSA DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A
AXONOTMSE DO NERVO ISQUIÁTICO / Denis Guilherme Guedert ;
orientador, Edison Sanfelice André - Florianópolis, SC,
2014.

119 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Inclui referências

1. Ciências Fisiológicas. 2. Axonotmese. 3. Nervo
Isquiático. 4. Nado forçado. 5. Lesão nervosa. I. Sanfelice
André, Edison. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Um muito obrigado...

Aos meus pais pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador Professor Edison Sanfelice André, um mentor e amigo.

Aos membros da banca que prontamente aceitaram o convite.

Aos professores e demais profissionais que me ajudaram nas análises: Professor Eduardo e seus alunos Marcus e Fábio (UFSC) pela ajuda no processamento biomolecular das amostras. Ao Professor Marino (UFSC) pela ajuda na colaração dos nervos.

As funcionárias do laboratório de patologia da Furb, Elizia e Neli pela ajuda com as lâminas histológicas.

Aos amigos do Instituto educacional Santa Catarina – Faculdade Jangada pelo apoio e palavras de incentivo.

Aos amigos do laboratório de anatomia humana da FURB, sempre presentes desde minha graduação.

Aos demais amigos e familiares por acompanharam de longe esta caminhada.

RESUMO

Lesões do sistema nervoso periférico são comuns e acarretam perdas tanto sensitivas quanto motoras, tais lesões interferem na vida do indivíduo devido a diminuição do rendimento profissional.

O exercício físico é um dos meios empregados no tratamento das lesões nervosas periféricas. No entanto, a grande quantidade de dados conflitantes a respeito do tema estimula a realização de mais experimentos e o uso de novas técnicas de análise que possam nos ajudar a entender os efeitos reais do exercício sobre o processo de regeneração nervosa periférica.

Neste estudo utilizamos quatro grupos de animais (G1 a G4), submetidos a um protocolo de treinamento (nado forçado) nas seguintes condições: G1 – grupo controle sedentário, G2 – Grupo submetido ao exercício diariamente durante 21 dias 24 horas após a lesão nervosa, G3 – grupo submetido ao exercício 7 dias após a lesão durante 14 dias, G4 – grupo submetido ao exercício 24 horas após a lesão porém realizando em dias alternados, dia sim, dia não. Todos os animais foram submetidos a uma lesão nervosa tipo axonotmese, pelo estrangulamento do nervo isquiático. As variáveis estudadas foram funcionais, eletromiográficas, biomoleculares e morfológicas.

Nossos dados apontam para uma melhora funcional observada através do índice funcional do isquiático nos grupos exercitados, é possível constatar também um incremento na produção de fatores neurotróficos (BDNF e NGF) coincidindo com a diminuição da expressão da enzima iNOS e da citocina TNF – α nos grupos exercitados. Nossos dados eletromiográficos mostram um padrão semelhante de recuperação em todos os grupos. Os dados morfológicos mostram que ao 21º dia os músculos gastrocnêmios provenientes do lado experimental encontram-se com grandes áreas de atrofia, os nervos isquiáticos tanto no coto proximal quanto distal mostram áreas extensamente desnervadas.

Em suma acreditamos que o exercício da maneira que foi proposto possa contribuir de forma positiva com o processo de regeneração nervosa periférica.

PALAVRAS – CHAVE: Lesão nervosa periférica, axonotmese, nervo isquiático, regeneração nervosa.

ABSTRACT

Lesions of the peripheral nervous system are common and carry both sensory and motor losses, such lesions interfere with the individual's life due to decreased job performance.

Exercise is one of the means employed in the treatment of peripheral nerve injuries. However, the large amount of conflicting data regarding the subject stimulates performing more experiments and the use of new analytical techniques that can help us understand the real effects of exercise on the process of peripheral nerve regeneration.

In this study we used four groups of animals (G1 to G4), underwent a training protocol (forced swim) as follows: G1 - control sedentary group , G2 - Group submitted to exercise daily for 21 days 24 hours after nerve injury, G3 - group submitted to exercise 7 days after injury for 14 days , G4 - the group submitted to exercise 24 hours after injury but performing on alternate days , day in, day out . All animals underwent a nerve injury Axonotmesis sort by strangulation of the sciatic nerve. The variables studied were functional , electromyographic, biomolecular and morphological .

Our data point to a functional improvement observed through the sciatic functional index in the exercised groups, you can also see an increase in production of neurotrophic factors (BDNF and NGF) coinciding with the decreased expression of iNOS and cytokine TNF - α in exercised groups . Electromyographic data show a similar pattern of recovery in all groups. The morphological data show that after 21 days the gastrocnemius muscles from the side experimental are with large areas of atrophy, the sciatic nevi in both proximal and distal stump show extensively denervated areas .

In short we believe that exercise the way it was proposed to contribute positively to the process of peripheral nerve regeneration .

KEY - WORDS : Peripheral nerve injury , Axonotmesis, ischiatic nerve, nerve regeneration .

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – A) Representação esquemática do nervo com suas bainhas de revestimento. B) Representação da vascularização de um nervo.....24
- Figura 2 – Classificação de Seddon (Neuropraxia, axnotese e neurotmeze) e de Sunderland (Tipologia de I a V), Seta indica local de uma lesão.....26
- Figura 3 – A) Eventos após lesão inicial, início da degeneração retrógrada e Walleriana. B) Notar início da cromatólise no corpo celular. Formação do cone de crescimento ao nível do internódulo anterior a lesão. Macrófagos invadem o local e fagocitam bainha de mielina. C) Brotamento de vários axônios através do cone de crescimento. Células de Schwann desacopladas da bainha de mielina formam um cordão (Banda de Büngner). D) Axônio alcança o órgão alvo, demais brotamentos que não tiveram sucesso sofrem degeneração. E) Regeneração mal sucedida com formação de neuroma.....29
- Figura 4 – A): Representação esquemática de uma unidade motora com um determinado número de fibras musculares. A somatória dos potenciais de ação de cada fibra muscular são captadas pelo eletrodo. Modificado de Carrenõ, *et. al*; 2013. B) Um potencial de ação motor com os eixos de amplitude, dada em Milivolts e duração, dada em milisegundos.....33
- Figura 5 – A) Potenciais de unidade motora normais. B1) Estado relaxado. B2) Contração muscular. B3) Contração muscular mais acentuada gerando padrão interferencial.34
- Figura 6 – A) Potencias de ação de fibrilação em músculo desnervado. (Modificado de Navarro, 2013). B) Ondas positivas agudas (*). Mills, 2013. C) Traçado de músculo em processo de reinervação durante contração muscular.....36
- Figura 7 – Recipiente utilizado em nosso laboratório para promover nado forçado dos animais.....46
- Figura 8 – Eletrodos confeccionados em nosso laboratório.....47

Figura 9 – A) Posição do animal na bancada para realização da cirurgia. B) Eletrodos implantados em ambos os gastrocnêmios, os fios atravessam inferiormente a pele do animal e saem na região dorsal. C) Fios soldados ao conector no dorso do animal, notar as extremidades metálicas cobertas de acrílico.....49

Figura 10 – : Impressão plantar de rato e medidas utilizadas no cálculo do IFC.....50

Figura 11 – Fórmula para o cálculo do IFC modificada por Bain *et. al.* em 1989, onde, E = Pata experimental, N = Pata normal.....51

Figura 12 – Passarela do IFC utilizada em nosso laboratório.....51

Figura 13 – Rato na passarela do IFC, vista inferior.....52

Figura 14 – A. Equipamento utilizado na captação do sinal, Biopac® modelo MP – 150 acoplado a dois pré – amplificadores EMG – 100 C. B. : Imagem do monitor durante registro, notar os dois traçados superiores (sinais brutos) e os dois traçados inferiores (média RMS).....54

Figura 15 – Caixa onde o animal permanecia durante o registro.....55

Figura 16 – Valores do Índice Funcional do Ciático (IFC) dos diferentes grupos ao longo de 21 dias de experimentação. (*) Diferenças significantes em relação ao primeiro dia pós-axonotmese; (#) Diferenças significantes em relação ao sétimo dia pós-axonotmese; (%) Diferenças significantes em relação ao décimo quarto dia pós-axonotmese. $p<0,001$62

Figura 17 – Valores comparativos do Índice Funcional do Ciático (IFC) dos diferentes grupos durante os quatro momentos da coleta dos dados pós-axonotmese. Grupo 2 – exercitados diariamente durante 21 dias; Grupo 3 – exercitados diariamente com início ao sétimo dia pós-axonotmese; Grupo 4 – exercitados em dias alternados com início 24 horas após axonotmese. (*) Diferenças significantes em relação ao grupo controle. $p<0,01$65

Figura 18 – : Sinais eletromiográficos referentes a pata experimental. A) Trecho total de 8 segundos mostrando potencias de fasciculação (setas), barra horizontal de 80 milissegundos. B) Mesmo trecho do traçado A, convertido em RMS, barra horizontal de 80 milissegundos. C) Um potencial de fasciculação retirado do traçado A, observar característica polifásica (seta), barra horizontal de 50,000 milissegundos, tempo total do traçado de 0,50 segundos. D) Registro bruto de 8 segundos mostrando potencias de fibrilação (setas). E) Potencias de fibrilação convertidos em RMS, tempo de 8 segundos. E) Ampliação do sinal bruto visto na figura D, setas mostram potencias de fibrilação, tempo total de registro de 0,50 segundos, barra horizontal de 50,000 ms.....68

Figura 19 – Traçados eletromiográficos do rato representante do G1, no período de 24 horas após a lesão. A) trecho de 8 segundos do lado experimental. B) RMS do trecho A. C) Trecho de 8 segundos do lado sadio, notar período de contração muscular (CM). D) RMS do trecho C, notar a onda referente ao período de contração muscular, característica senóide (S). Barra horizontal, 0,80 milissegundos para todos os trechos.....67

Figura 20 – Traçados eletromiográficos do animal representante do G2 período de 24 horas após a lesão. A) Período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental. B) RMS do traçado A. C) Traçado bruto do lado sadio, notar abaulamento no sinal causado pela contração muscular (CM), setas apontam artefatos no sinal. D) RMS do traçado D, contração muscular característica convertida em onda senóide (S), setas apontam exemplos de alguns artefatos.....69

Figura 21 – Traçado eletromiográfico de animal do G3, período de 24 horas após a lesão. A) Período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental. B) RMS do traçado A. C)

período de 8 segundos referente a pata sadia, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. barra 80 milissegundos.....70

Figura 22 – Traçado eletromiográfico do animal do G4. A) Sinal bruto proveniente do lado experimental, período de 8 segundos. B) RMS do traçado A. C) período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado sadio, notar período de contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. barra horizontal de 80 milissegundos.....71

Figura 23 – Traçado eletromiográfico de animal do G1 período de sete dias após a lesão. A) período de 8 segundos de traçado bruto do lado experimental, setas na figura apontam potenciais de fasciculação. B) RMS do traçado A, notar potencias espontâneos indicado pelas setas. C) Período de 8 segundos de traçado bruto do lado sadio, notar contração muscular (CM) evidente na parte média do sinal, seta indica possível artefato. D) RMS do traçado C, notar onda senóide causada pela contração muscular, seta indica possível artefato. Barra horizontal de 80 milissegundos.....73

Figura 24 – Traçado eletromiográfico de rato do G2 período de sete dias após a lesão. A) Período de 8 segundos de traçado bruto do lado experimental, setas indicam potencias espontâneos. B) RMS do traçado A, setas indicam potenciais espontâneos. C) período de 8 segundos de traçado bruto do lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 80 milissegundos.....74

Figura 25 – Traçado eletromiográfico de rato do G3 período de sete dias após a lesão nervosa. A) Período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental, notar potencias espontâneos mostrado pelas setas. B) RMS do traçado A. C) período de 8 segundos referente ao registro do lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 80 milissegundos.....75

Figura 26 – Traçado eletromiográfico de rato do G4 período de sete dias após a lesão nervosa. A) período de 8 segundos de traçado bruto do membro experimental, notar potenciais espontâneos apontados pelas setas. B) RMS do traçado A, potenciais espontâneos também presentes (setas). C) período de 8 segundos referente ao membro sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 80 milissegundos.....76

Figura 27 – Traçado eletromiográfico de animal do G1 período de quatorze dias após a lesão. A) Período total de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental, notar contração muscular aparecendo (CM), notar também potenciais espontâneos (setas). B) RMS do traçado A. C) Período de 8 segundos de traçado bruto proveniente do lado sadio, notar contração muscular (CM) e alguns artefatos no sinal (setas). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 80 milissegundos.....78

Figura 28 – Traçado eletromiográfico de animal do G2, período de quatorze dias após a lesão. A) Período de 8 segundos de traçado bruto do lado experimental, notar contração muscular (CM), e potenciais espontâneos (setas). B) RMS do traçado A. C) Traçado de 8 segundos referente ao lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 80 milissegundos.....79

Figura 29 – : Traçado eletromiográfico de rato do G3, período de quatorze dias após a lesão. A) período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental, notar contração muscular (CM) acompanhado de potenciais espontâneos (setas). B) RMS da figura A. C) Traçado bruto do lado sadio, notar contração muscular (CM), setas indicam possíveis artefatos. Barra horizontal de 80 milissegundos.....81

Figura 30 – Traçados eletromiográficos de rato do G4, período de quatorze dias após a lesão. A) período total de 8 segundos do lado experimental, notar período de contração muscular (CM). B) RMS do traçado A. C) Período de 8 segundos referente ao lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. barra horizontal de 80 milissegundos.....82

Figura 31 – Traçado eletromiográfico de rato do G1, período de 21 dias após a lesão. A) Período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental, notar contração muscular (CM). B) RMS do traçado A. C) Trecho de 8 segundos referente ao lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 0,80 milissegundos.....84

Figura 32 – Traçado eletromiográfico de rato do G2, período de 21 dias após a lesão. A) Traçado de 8 segundos referente ao lado experimental, notar contração muscular (CM). B) RMS do traçado A. C) Período de 8

segundos de traçado do lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 0,80 milissegundos.....85

Figura 33 – Traçado eletromiográfico de rato do G3, período de 21 dias após a lesão. A) Traçado bruto do lado experimental (período de 8 segundos) notar contração muscular (CM). B) RMS do traçado A. C) Traçado bruto referente a lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 0,80 milissegundos.....86

Figura 34 – : Traçado eletromiográfico de rato do G4, período de 21 dias após a lesão. A) Traçado bruto proveniente do lado experimental, período de 8 segundos, notar contração muscular (CM). B) RMS do traçado A. C) Traçado bruto proveniente do lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 0,80 milissegundos.....87

Figura 35 – : Fotomicrografia dos músculos gastrocnêmios direitos dos grupos G1 ao G4, A,B,C e D respectivamente. Notar fibras com a perda da morfologia poligonal típica (*), aproximação dos núcleos (setas finas), e aumento na proliferação do tecido conjuntivo (setas espessas), Magnificação de 200X, coloração Hematoxilina – eosina.....89

Figura 36 – Fotomicrografias das porções proximais dos nervos isquiáticos direitos dos grupos G1 ao G4, A,B,C e D respectivamente. Notar degeneração do tecido (setas finas), e fibras mielinizadas preservadas (setas espessas). Magnificação de 400X, coloração de Giemsa.....90

Figura 37 – Fotomicrografias das porções distais dos nervos isquiáticos direitos dos grupos G1 ao G4, A,B,C e D respectivamente. Notar degeneração do tecido (setas finas), e fibras mielinizadas preservadas (setas espessas). Magnificação de 400X, coloração de Giemsa.....91

Figura 38 – Quantificação dos fatores neurotróficos BDNF, NGF, enzima iNOS e da citocina TNF – α , G1= grupo1, G2= grupo 2, G3= grupo3, G4= grupo 4. A) Quantificação da expressão de BDNF. B)

Quantificação da expressão de NGF. C) Quantificação da expressão de iNOS. D) Quantificação da expressão de TNF – α94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro.
cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar.
CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CT – Ciclo limiar.
CM – Contração muscular
DNA – Ácido desoxirribonucleico.
EMG – Eletromiografia.
G1 – Grupo 1.
G2 – Grupo 2.
G3 – Grupo 3.
G4 – Grupo 4.
GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.
IFC – Índice funcional do isquático.
IL – 1 β – Interleucina 1 Beta.
IL – 6 – Interleucina seis.
iNOS – Enzima óxido nítrico sintase induzida.
IT – Largura média da pegada.
MAG – Glicoproteína associada a mielina.
ms – Milissegundos.
mV – Milivolts.
NGF – Fator de crescimento neural.
NT – 3 – Neurotrofina 3.
PCR – Reação de polimerização em cadeia.
PL – Comprimento total da pegada.
RMS – Valor quadrático médio.
RNA – Ácido ribonucleico.
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro.
RT-PCR – Reação de polimerização em cadeia em tempo real.
TNF – α – Fator de necrose tumoral Alfa.
TrKA – Tirosina quinase A.
TrKB – Tirosina quinase B.
TS – Largura total da pegada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Morfologia do nervo	23
1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NERVOSAS	25
1.3 FISIOLOGIA DA LESÃO E REGENERAÇÃO	26
1.4 BASES BIOMOLECULARES	31
1.5 BASES ELETROFISIOLÓGICAS	32
1.6 TRAÇADO ELETROMIOGRÁFICO NORMAL E ALTERADO	33
1.7 EXERCÍCIO E LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA	37
1.8 RECUPERAÇÃO FUNCIONAL	39
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 AMOSTRA	45
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL E PROTOCOLO DE TREINAMENTO	45
4.3 LESÃO EXPERIMENTAL E IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS	46
4.3.1 Confeccção dos eletrodos	46
4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	48
4.5 ANÁLISE FUNCIONAL	50
4.6 ANÁLISE ELETROMIOGRÁFICA	53
4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA	56
4.7 ANÁLISE BIOMOLECULAR	56
5 RESULTADOS	61
5.1 IFC	61
5.2 ANÁLISE DO SINAL ELETROMIOGRÁFICO	63
5.2.1 Vinte e quatro horas pós – lesão	66
5.2.2 Sete dias após a lesão	72
5.2.3 Quatorze dias pós – lesão	77

5.2.4 Vinte e um dias pós – lesão	83
5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA	88
5.3.1 Músculo gastrocnêmio	88
5.3.2 Nervo isquiático	90
5.4 ANÁLISE BIOMOLECULAR, RT-PCR	91
6 DISCUSSÃO	95
7 CONCLUSÃO	105
8 REFERÊNCIAS	107
9 ANEXO A – Cópia digitizada do projeto original aprovado pelo comitê de ética	119

1. INTRODUÇÃO

Lesões traumáticas do sistema nervoso periférico são comuns na sociedade industrializada atual, é um tipo de problema encontrado com frequência na atividade clínica diária, e pelo geral ocasionam déficits funcionais significativos na população afetada, estas podem ser temporárias ou permanentes. Tais lesões levam a perdas tanto motoras quanto sensoriais que podem interferir de forma muito acentuada na qualidade de vida e atividade profissional do indivíduo (NOBLE *et.al.*, 1998). Diversas são as causas que geram as lesões nervosas, entre elas estão, as atividades profissionais, domésticas, esportivas, acidentes automobilísticos e agressões físicas (TOTH, 2009 ; BATISTA, ALMEIDA; 2008).

Na prática clínica os diversos programas de atividade física são muitas vezes empregados de forma empírica em pacientes com neuropatias periféricas, tendo como base apenas a experiência do profissional reabilitador (ILHA *et.al.*, 2007).

Um dos problemas neste tipo de pesquisa é a quantificação do processo de regeneração nervosa. Os estudos morfológicos, eletrofisiológicos e funcionais são bem estabelecidos como meio de avaliação, mas a correlação entre eles é por vezes escassa (VEAS, 2009).

Este trabalho busca avaliar os dados obtidos através de análises funcionais eletrofisiológicas, morfológicas e biomoleculares, resultantes de ratos submetidos a diferentes rotinas de exercício após uma lesão nervosa periférica experimental.

1.1 Morfologia do nervo

Os nervos são descritos classicamente como cordões esbranquiçados, achatados ou levemente cilíndricos. A classificação anatômica utiliza-se de termos como nervo craniano para descrever os nervos que possuem funções especiais e tem sua origem no telencéfalo, diencéfalo e tronco encefálico, e nervos espinais (periféricos) que se originam de algum segmento da medula espinal e dirigem – se para o tecido alvo (MENESES, 2011).

A diferença entre um nervo e outro é melhor diferenciada quanto a sua função uma vez que a estrutura não irá variar significativamente. De forma geral os nervos são uma via de mão dupla

levando o impulso nervoso para o tecido alvo, (eferentes) e trazendo o impulso para o sistema nervoso central (aférentes) (KIERNAN, 2003).

Os axônios ou fibras nervosas possuem um revestimento lipídico denominado de bainha de mielina, esta no sistema nervoso periférico é fabricada pelas células de Schwann, similares em função aos oligodentrócitos do sistema nervoso central (MENESES, 2011; TREPEL, 2005).

A bainha de mielina não é um envoltório contínuo, e sim interrompido pelos internódulos, cada internódulo marca o início e o fim de um envoltório mielínico chamado de nodo de Ranvier (KIERNAN, 2003).

Coleções de fibras nervosas são envoltas por tecido conjuntivo. Cada fibra nervosa está envolta por uma membrana delicada denominada de endoneuro, várias fibras agrupam-se formando um feixe nervoso envolto por uma segunda membrana chamada de perineuro. Por fim, os feixes nervosos dentro de um nervo estão envoltos pela última membrana, o epineuro (WALDRAM, 2003), (Figura 1A). Vasos sanguíneos transitam entre estas membranas de tecido conjuntivo formando uma rica rede capilar, esta é importante no fornecimento de nutrientes para as células em caso de lesão (LEE e WOLF, 2000), (Figura 1B).

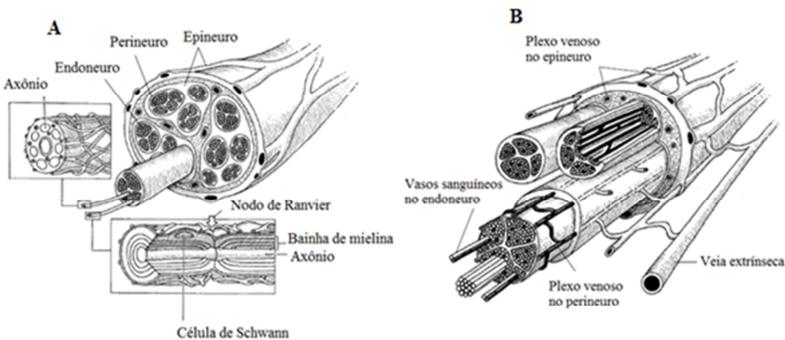


Figura – 1: A) Representação esquemática do nervo com suas bainhas de revestimento. B) Representação da vascularização de um nervo. (Modificado de Lee e Wolfe, 2000).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NERVOSAS

As lesões nervosas de ordem traumática são classificadas em três tipos conforme o grau de injúria sofrido pela fibra nervosa. São elas; neuropraxia, axonotmese e neurotmese.

Esta classificação foi elaborada por Seddon em 1943 e baseia-se no grau de ruptura sofrido internamente pela fibra nervosa (SARZENSKI, 2010).

Segundo Seddon, na neuropraxia ocorre uma lesão leve com baixa perda motora e sensitiva, ocorre um bloqueio na condução nervosa devido a uma contusão ou compressão, no entanto, a fibra nervosa permanece íntegra, a recuperação é completa em poucos dias ou semanas.

A axonotmese corresponde a uma típica lesão por esmagamento com perda da continuidade axonal e conseqüente degeneração da bainha de mielina (degeneração Walleriana), porém, sem perda das células de Schwann uma vez que o tecido conjuntivo de suporte permanece íntegro.

A neurotmese é a lesão de maior gravidade, ocorre uma secção total do nervo com perda total de sua continuidade, pode ser causada por fraturas, cortes profundos, ferimentos com arma de fogo entre outros (SIQUEIRA, 2007).

Uma nova forma de classificação das lesões nervosas foi proposta por Sunderland em 1978, este organizou a classificação de Seddon em cinco tipos conforme o grau de agressão sofrido pelo tecido. A lesão tipo I corresponde a neuropraxia descrita por Seddon. Na lesão tipo II ocorre degeneração do axônio distal ao local da lesão porém, o endoneuro permanece íntegro. Nas lesões III e IV além da perda do axônio perde-se também o endoneuro e o perineuro respectivamente. A secção completa do nervo com perda axonal e de tecido conjuntivo (incluindo o epineuro) é uma lesão tipo V. A figura 2 mostra a correlação entre a classificação adotada por Seddon e por Sunderland.

Na prática a classificação de Sunderland é pouco utilizada prevalecendo a proposta de Seddon (DEUMENS *et.al*, 2010; SIQUEIRA, 2007). Há ainda o modelo proposto por Birch em 2005 que categoriza as lesões em degenerativas quando há qualquer grau de descontinuidade da estrutura do axônio (axonotmese e neurotmese), e não degenerativas quando mantem-se a viabilidade do axônio (neuropraxia), este também é válido pois, de forma simples faz referência direta ao grau de integridade do axônio (VEAS, 2009).

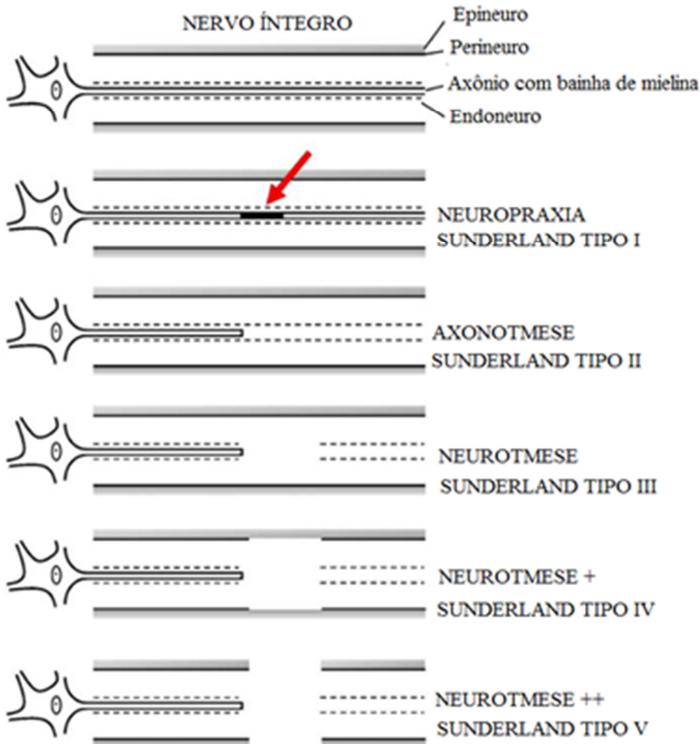


Figura – 2: Classificação de Seddon (Neuropraxia, axotese e neurotmese) e de Sunderland (Tipologia de I a V), Seta indica local de uma lesão. (Modificado de Deumens *et.al.* 2010).

1.3 FISILOGIA DA LESÃO E REGENERAÇÃO

A lesão do sistema nervoso periférico leva a perda parcial ou total das funções sensitivas, e/ou motoras e vegetativas. Isso se dá pois ocorre a descontinuidade axonal, degeneração das fibras distais a lesão e eventual morte de alguns neurônios (NAVARRO *et.al.*, 2007).

Mesmo após a lesão, o transporte anterógrado continua, o transporte retrógrado no coto distal também persiste por vários dias. Em consequência, as extremidades interrompidas intumescem devido ao acúmulo de organelas incapazes de progredir para além do local da lesão. Peptídeos vasoativos tal como o CGRP (Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), acumulam-se em torno do coto proximal e possivelmente contribui para a hiperemia local em torno da lesão (HALL, 2005).

Quando o axônio perde a continuidade com o corpo celular, tal qual em uma lesão tipo axonotmese ou neurotmese, a porção proximal sofre degeneração geralmente até o primeiro internódulo, este processo é denominado degeneração retrógrada ou primária. Por sua vez, a porção distal pela perda de continuidade com o restante da célula sofre degeneração Walleriana, (SOBRAL *et.al.*, 2008). Esta é caracterizada pela fagocitose e remoção dos resíduos provenientes do processo degenerativo. (BURNETT e ZAGGER, 2004).

O termo degeneração Walleriana foi adotado para descrever uma série de mudanças que ocorrem após lesão a axonal, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico.

Embora o termo seja usado para ambos, as células envolvidas não são as mesmas, tem-se a participação das células de Schwann e macrófagos no sistema nervoso periférico e dos oligodentrócitos no sistema nervoso central (ROTSHENKER, 2011).

A degeneração Walleriana desencadeia uma forte resposta inflamatória, onde as células de Schwann tem papel importante (YDENS *et.a.*, 2012). Estas células induzem a produção de citocinas pró – inflamatórias tais como, fator de necrose tumoral (TNF), e interleucinas, IL-1 α e IL-1 β (SHAMASH *et.al.*, 2002). Posteriormente estas citocinas induzirão a expressão de mediadores imunes adicionais, que ao final da cascata de eventos favorecerão o recrutamento de macrófagos, células T e neutrófilos para a área lesionada do nervo (PERRIN *et.al.*, 2005).

Há duas populações de macrófagos no nervo periférico lesado, os residentes e os que são recrutados. Tanto um quanto outro respondem rapidamente a lesão, embora os macrófagos residentes, que constituem cerca de 4% da população celular do endoneuro tendem a responder mais rapidamente (MUELLER *et.al.*, 2001).

Os macrófagos ao chegarem no local da lesão atraídos pela citocinas citadas anteriormente irão penetrar nos tubos das células de Schwann e iniciar o processo de degradação da mielina, com posterior fagocitose dos detritos. A remoção destes detritos é uma etapa essencial uma vez que, de outro modo, a glicoproteína associada a mielina (MAG) iria inibir o crescimento axonal (VEAS, 2009; HALL, 2005).

Todavia, este fenômeno degenerativo é importante visto que cria um ambiente propício para os axônios sobreviventes regenerarem-se. (CAMPBELL, 2008).

As células de Schwann, através das interdigitações do seu citoplasma, se alinham na membrana basal do axônio para formar colunas de células chamadas de bandas de Büngner, ou faixas de Von

Bünger (JOHNSON *et.al.*, 2005; LARS e DAHLIN 2004; KIERNAN, 2003). Estas bandas tem como objetivo guiar os axônios em regeneração ao tecido alvo.

O tipo de lesão nervosa influencia o sucesso da regeneração das fibras interrompidas uma vez que, lesões por esmagamento ou lesões focais por congelamento tendem a apresentar maior sucesso durante a regeneração, se comparadas a lesões onde o nervo sofre secção. Isso deve-se ao fato de que lesões mais brandas mantêm a membrana basal intacta, aumentando a chance dos brotos crescerem dentro das bandas de Bünger e atingirem o tecido (GRIFFIN *et.a.*, 2010).

Quanto a velocidade de regeneração, parece haver uma taxa de crescimento axonal de 3,0 a 4,5 mm/dia em lesões tipo axonotmese no nervo isquiático de ratos. Em humanos estima-se uma média 1,0 a 2,0 mm/dia, em nervos dos membros em geral, embora essas taxas não sejam lineares (SIQUEIRA, 2007; LUNDBORG, 1987).

As alterações patológicas não limitam-se somente ao segmento lesionado, o corpo celular passa por um processo denominado de cromatólise, onde ocorre aumento de seu volume bem como aumento do núcleo e nucléolo, deslocamento do núcleo para uma posição excêntrica, dissolução dos corpos de Nissl e retração dos dendritos. (SARZENSKI, 2010; JOHNSON *et.al.*, 2005). Na figura 3 observa-se esquematicamente as etapas do processo de degeneração.

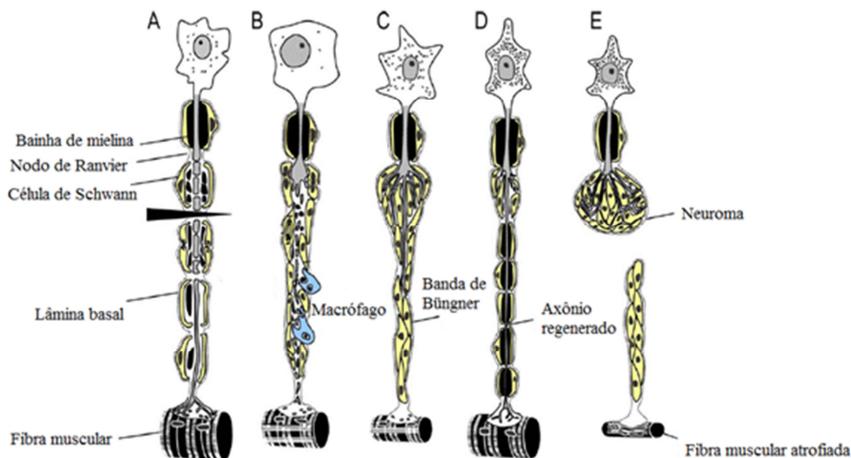


Figura – 3: A) Eventos após lesão inicial, início da degeneração retrógrada e Walleriana. B) Notar início da cromatólise no corpo celular. Formação do cone de crescimento ao nível do internódulo anterior a lesão. Macrófagos invadem o local e fagocitam bainha de mielina. C) Brotamento de vários axônios através do cone de crescimento. Células de Schwann desacopladas da bainha de mielina formam um cordão (Banda de Büngner). D) Axônio alcança o órgão alvo, demais brotamentos que não tiveram sucesso sofrem degeneração. E) Regeneração mal sucedida com formação de neuroma. (Modificado de Deumens *et.al.* 2010).

Além de favorecer mecanicamente o meio para o crescimento axonal, outra capacidade das células de Schwann é a de secretar fatores neurotróficos tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro, (BDNF – *Brain derived neurotrophic factor*) e o fator de crescimento neural (NFG – *neural growth factor*), (CUNHA, 2010; IDE, 1996).

Estes são importantes no desenvolvimento, manutenção e plasticidade do sistema nervoso (ARON e KLEIN, 2011). Ambos são polipeptídeos pertencentes a família das neurotrofinas. Os membros desta família ligam-se aos receptores tirosina quinase, a saber, TrKA receptor do NGF e TrKB receptor do BDNF (JOHNSON *et.al.*, 2008).

Durante a lesão nervosa, a expressão destes fatores encontra-se aumentada, retornando a padrões normais após a completa regeneração axonal (MARTINELLI *et. al.*, 2002).

Sabe-se que o BDNF derivado das células de Schwann e motoneurônios desempenha papel fundamental na recuperação do

axônio após lesão nervosa (GORDON, 2009; ALLEN e DAWBARN, 2006), pois atua de forma geral facilitando a regeneração do axônio (WIHELM *et.al.*, 2012; SEBBEN *et.al.*, 2011; ENGLISH *et.al.*, 2009).

Em meados dos anos 50, introduziu-se o conceito de fator de crescimento neural, referindo-se ao NGF, uma nucleoproteína retirada do sarcoma de ratos. Dotada da capacidade de melhorar o crescimento das células nervosas, descobriu-se alguns anos mas tarde que o NGF não era uma nucleoproteína, e sim uma proteína, passando a ser identificada como tal (GODOY, 2003; GUARDIA, 1992).

A respeito da atividade do NGF, seus níveis aumentam em nervos danificados em resposta a uma lesão, este fator atua de maneira geral a promover a proliferação e diferenciação de neurônios (SEBBEN *et.a.*, 2011; PETRUSKA e MENDELL, 2004).

O NGF atua principalmente promovendo a sobrevivência e crescimento dos axônios de neurônios sensoriais. Este fator suporta a sobrevivência de neurônios sensoriais do gânglio da raiz posterior da medula espinal, também durante a fase embrionária. Além de estar relacionado a sobrevida de neurônios do sistema nervoso simpático. Seu papel na recuperação da função do neurônio motor é limitado ou até mesmo ausente, devido a estas células não expressarem de forma elevada os receptores TrKA (MADDURI e GANDER; 2010; JOHNSON *et.al.*, 2008).

Porém, os efeitos do NGF sobre neurônios motores poderiam se dar de forma indireta. Após lesão ha um aumento da expressão de receptores p75 em neurônios motores, este receptor possui uma baixa afinidade pelo NGF. A promoção do crescimento nervoso por conseguinte, poderia ser atribuída a interação do NGF com este receptor (SEBBEN *et.al.*, 2011; ERNFORS *et.al.*, 1989).

A recuperação nervosa saudável depende também do tecido muscular viável, este também é capaz de liberar fatores neurotróficos para estimular o crescimento axonal. Se o tecido muscular desnervado começa a se tornar fibrótico, estes fatores não podem ser liberados (FEINBERG, 2006).

É importante destacar o papel da enzima óxido nítrico sintase (NOS), esta é responsável pela produção de óxido nítrico (NO), um radical livre gasoso gerado pela maioria das células frente a uma diversidade de estímulos. Esta molécula pode apresentar efeitos protetores no sistema nervoso, no entanto, há evidencias de que níveis aumentados resultem em citotoxicidade (EMIRANDETTI *et.al.*, 2010; CONTI *et.al.*, 2004).

A NOS apresenta três isoformas reconhecidas, sendo a isoforma II ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS), de maior relevância quando se trata de processos de degeneração/regeneração nervosa periférica (WONG, 1996).

Em condições fisiológicas a iNOS não é expressa em nervos isquiáticos, mostrando que a mesma não está envolvida na regulação fisiológica normal deste nervo (LIN *et.al.*, 2011). No entanto, já se tem bem descrito que após lesão do nervo isquiático a expressão de iNOS aumenta drasticamente (LEVY *et.al.*, 1999). Sua expressão se dá por astrócitos e macrófagos via enzima L-arginina, esta claro que o dano causado pela inflamação é a razão para a expressão aumentada desta enzima, embora seu papel no processo regenerativo ainda permaneça obscuro (LIN *et.al.*, 2011).

A quantidade de NO produzido irá via de regra determinar se ele irá atuar de forma a proteger ou se tornar tóxico para o tecido. Pequenas quantidades são necessárias para o estado de homeostasia, grandes quantidades como as produzidas via iNOS invariavelmente tem ação tóxica (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

Resultados de Sunico e Lopez mostram que o óxido nítrico interfere com o processo normal de diferenciação das células de Schwann, este é necessário para alterar a forma das células com o intuito de se alinharem em bandas de Büngner (SUNICO e LOPEZ, 2010).

O óxido nítrico também é um potencial mediador no que se refere a característica da dor pós-lesão nervosa. Considera-se que a enzima ciclo-oxigenase-2 expressa pelos macrófagos que permanecem dentro do endoneuro após a fase inicial de retirada dos detritos, seja uma mediadora da dor neuropática crônica vista nas lesões nervosas periféricas (HALL, 2005).

1.4 BASES BIOMOLECULARES

Como citado anteriormente, os fatores neurotróficos são polipeptídeos que participam ativamente do processo regenerativo, é possível quantificar sua expressão no tecido através de técnicas biomoleculares específicas. Uma delas, é a reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR). Desenvolvida em 1985 por Randall Saiki e aperfeiçoada em 1987 por Kairy Mullis, ambos bioquímicos, a RT-PCR possibilita a amplificação de fragmentos de DNA (Ácido desoxirribonucleico) específicos, partindo-se de uma

quantidade mínima de DNA alvo ou RNA (Ácido ribonucleico) total, posteriormente convertidos em DNA complementar (cDNA), (RAHMAN *et.al.*, 2013).

O cDNA é uma ferramenta útil em estudos de expressão gênica, pois indica quais proteínas estão sendo expressas no tecido. É necessário escolher o *Primer* adequado que irá fazer a ligação com o fragmento de DNA a ser amplificado. Primers são fitas curtas de DNA artificiais, nucleotídeos complementares para o início e fim do fragmento (RAHMAN *et.a.*, 2013; JOSHI e DESHPANDE, 2010).

No campo experimental a RT-PCR vem sendo empregada como técnica auxiliar na investigação sobre os recursos que podem vir a acelerar o processo de regeneração nervosa periférica. Através dela é possível mensurar a expressão de fatores neurotróficos teciduais e, associado a outras técnicas de análise, fazer deduções a respeito dos resultados encontrados (ALRASHDAN *et.al.*, 2010).

Após um tratamento físico que visa acelerar o processo regenerativo, espera-se como resultado, uma expressão maior de fatores neurotróficos tais como NGF e BDNF, comparado a grupos não tratados (COBIANCHI, 2013).

1.5 BASES ELETROFISIOLÓGICAS

Uma unidade motora é formada pelo neurônio motor e pelas fibras musculares por ele inervadas. O número de fibras musculares em uma unidade motora varia de pouco menos de dez a várias centenas, dependendo do tamanho e da função do músculo em questão (KIERNAN, 2003; DE LUCA, 1997). O axônio conduz impulsos nervosos para as células musculares fazendo com que haja despolarização, esta se traduz em atividade elétrica manifestada na forma de potenciais de ação que podem ser registrados por um equipamento de eletromiografia (FORTI, 2005).

A eletromiografia pode ser definida essencialmente como sendo o estudo da função muscular através da averiguação do sinal elétrico proveniente do músculo (TAMEEM e STASHUK, 2013).

O Sinal captado pelo eletromiógrafo, representa a somatória dos potenciais de ação das unidades motoras, ocorridas durante a contração muscular em uma região abrangida pelo eletrodo (FORTI, 2005), (Figura 4A).

Os potenciais de unida motora apresentam basicamente dois componentes, duração e amplitude (Figura 4B).

O tempo de duração das unidades motoras é talvez uma das características mais importantes. Geralmente, o padrão de disparo de curta duração das unidades motoras é comumente observado em condições de miopatia, enquanto que unidades que apresentam perfil de longa duração são vistas em doenças neurogênicas. Embora este não seja um padrão ouro de diagnóstico (BLUM e RUTKOVE, 2007).

A duração compreende o tempo entre a primeira deflexão negativa vertical da onda, e o ponto onde esta retorna a linha de base. Este parâmetro reflete o número de fibras musculares em uma unidade motora (PRESTON e SHAPIRO; 2005; BINNIE, *et.al.*, 2004). É frequentemente utilizada como parâmetro de diagnóstico em eletromiografia clínica, uma vez que. Os valores normais em humanos são bem estabelecidos para cada músculo e faixa etária do indivíduo (CARRENÕ *et. al.*, 2013).

A amplitude do potencial de ação é muito mais sujeita a variação mesmo em sujeitos normais (PRESTON e SHAPIRO, 2005). Esta depende fortemente de fatores como, distância entre a agulha e a unidade motora, número de fibras musculares em uma unidade motora, e diâmetro das fibras musculares. (BLUM e RUTKOVE, 2007).

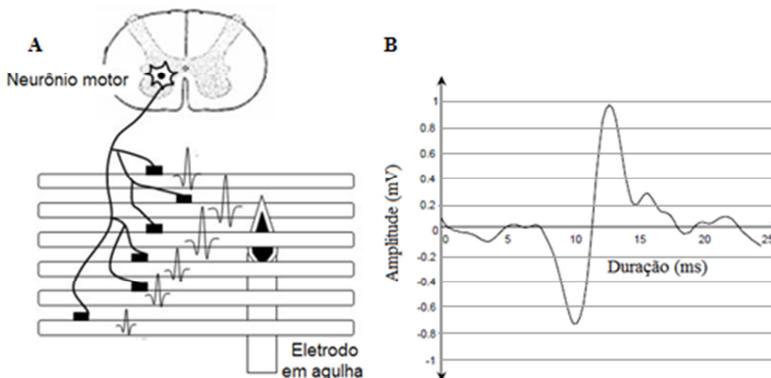


Figura – 4A): Representação esquemática de uma unidade motora com um determinado número de fibras musculares. A somatória dos potenciais de ação de cada fibra muscular são captadas pelo eletrodo. Modificado de Carrenõ, *et. al.*; 2013. B) Um potencial de ação motor com os eixos de amplitude, dada em Milivolts e duração, dada em milisegundos. (Modificado de De Luca; 2003).

Um exame de eletromiografia pode ser usado para averiguar a recuperação nervosa periférica, visto que os padrões eletromiográficos diferem entre músculos normais e desnervados. Quando um músculo em condições normais com inervação íntegra encontra-se em repouso, não se deve visualizar nenhuma atividade no eletromiógrafo. Observa-se somente a linha de base. Ao passo que, durante uma contração muscular é possível notar um número reduzido de potencias de unidade motora sendo cada uma delas separada uma da outra facilmente. Se a força muscular aumenta, incorporam-se ao sinal novos potencias que densificam o traçado (NAVARRO, 2013; QUAN e BIRD, 1999).

Durante a contração muscular, o sinal de EMG captado de um músculo que apresenta potencias de unidades motoras normais, deve mostrar um número de duas a quatro ondas que cruzam a linha de base. Este padrão é por vezes chamado de difásico, trifásico e até mesmo polifásico (NAVARRO, 2013; PRESTON e SHAPIRO, 2005), conforme mostrado na Figura 5A.

Se ocorrer uma contração muscular progressiva a linha de base tende a desaparecer mostrando um padrão denominado de interferencial (Figura 5 B3).

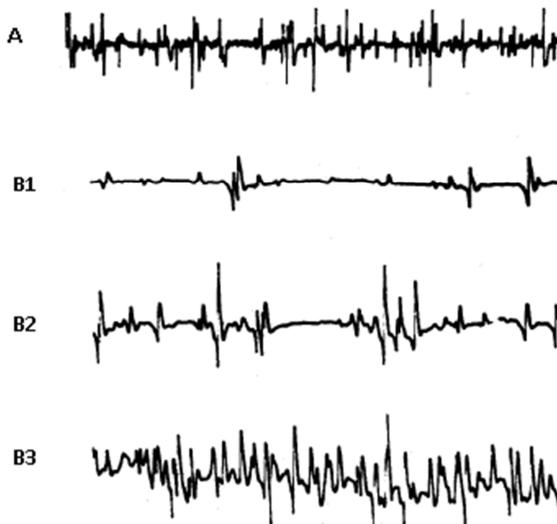


Figura – 5: A) Potenciais de unidade motora normais. B1) Estado relaxado. B2) Contração muscular. B3) Contração muscular mais acentuada gerando padrão interferencial. (Modificado de Navarro; 2013).

A primeira manifestação causada pela desnervação axonal é a presença de potenciais de fibrilação. Estes são muitas vezes considerados como marca da desnervação. Em humanos, estes potenciais aparecem entre a 1^o e a 4^o semana pós-lesão. Caracterizam-se inicialmente por amplitudes largas de aproximadamente 1mV, já a amplitude média que aparece dentro dos primeiros meses é de 0,6 mV caindo para 0,3mV em 6 meses (FEINBERG, 2006; BINNIE *et.al.*, 2004). Tais potenciais são representados na figura 6A.

Fibrilação é normalmente encontrada em qualquer doença do sistema nervoso em que existe lesão axonal causando perda de inervação das fibras musculares. Apesar destes potenciais serem causados sem dúvida, pela despolarização parcial da membrana muscular, o seu significado permanece desconhecido. Conforme procede a inervação após lesão, uma determinada fibra muscular terá o seu potencial de membrana em repouso restaurado e a despolarização espontânea cessará (BLUM e RUTKOVE, 2007).

Em sua morfologia apresentam-se como potenciais de curta duração, que podem ser tanto bifásicos mas, frequentemente trifásicos (NAVARRO, 2013; BINNIE *et.al.*, 2004).

Outras manifestações visualizada em um músculo em estado inicial de desnervação são as ondas positivas agudas (Figura 6B). Estas são similares as fibrilações, porém diferem em sua morfologia. Iniciam com uma forte deflexão positiva seguida por um período negativo prolongado. A amplitude varia entre 0,01 mV a 0,1 mV (PRESTON e SHAPIRO 2005). A taxa de disparo apresenta-se mais variável do que os potenciais de fibrilação, caracterizando a despolarização de uma única fibra muscular (BLUM e RUTKOVE 2007; MILLS, 2005).

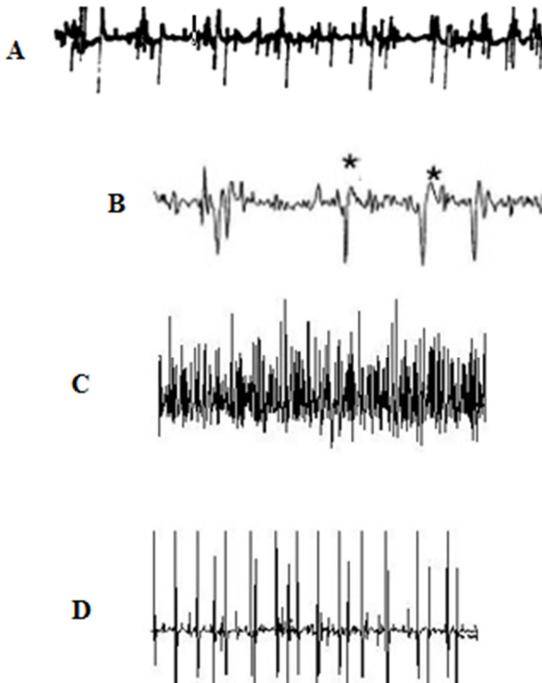


Figura – 6: A) Potencias de ação de fibrilação em músculo desnervado. (Modificado de Navarro, 2013). B) Ondas positivas agudas (*). Mills, 2013. C) Traçado de músculo em processo de reinervação durante contração muscular. Wu e colaboradores, 2013.

Uma vez que a eletromiografia oferece informações acerca da atividade elétrica muscular e com isso, dados sobre a qualidade da inervação em que se encontra o músculo, parece-nos que esta é uma ferramenta importante a ser levada em conta na avaliação da recuperação nervosa em diferentes fases de um programa de exercício. Dentre outros parâmetros pode-se extrair através de um exame eletromiográfico dados referentes a diminuição na amplitude dos potencias de ação, o que se relaciona com a diminuição do número de fibras nervosas recrutadas (WALDRAM, 2003).

Gramsbergen e colaboradores já no ano de 2000 utilizaram registros do músculo gastrocnêmio e tibial anterior durante a deambulação de ratos submetidos a uma lesão nervosa por esmagamento do isquiático. Estes autores serviram-se de variáveis tais como a inspeção da morfologia do sinal bruto, a amplitude do sinal e a taxa de disparo tanto do lado sadio quanto do lesionado, para fins de comparação (GRAMSBERGEN *et.al.*, 2000).

McDonald e seus colaboradores também em 2000, realizaram um estudo com 90 indivíduos, todos com algum grau de lesão nervosa periférica. Utilizaram a eletromiografia pela qual, através da classificação dos potenciais de fibrilação e das ondas positivas agudas, comparadas aos dados obtidos por exame de imagem por ressonância magnética do músculo, chegaram a conclusão de que; a eletromiografia é mais sensível que a ressonância magnética na detecção da desnervação muscular (MCDODALD *et.al.*, 2000).

A análise do sinal pode ser realizada de forma qualitativa e quantitativa. A análise qualitativa oferece informações visuais a respeito da morfologia do sinal. O método clássico de análise descrito também como semi-quantitativo consiste em utilizar o software de registro para a mensuração manual dos parâmetros, tais como amplitude, duração e frequência dos potenciais de ação, e posteriormente comparar estes dados com valores ditos normais. Por fim uma análise mais acurada se dá de forma quantitativa, esta se faz por intermédio de fórmulas matemáticas onde busca-se tratar os valores podendo ser estes paramétricos ou não paramétricos, e compará-los aos valores médios da amostra de referência (WU *et.al.*, 2013).

Uma das formas mais utilizadas para se extrair informações partindo de um sinal bruto de EMG, é através da determinação da raiz quadrada da média do sinal, (Root Mean Square – RMS). O Sinal bruto convertido em RMS representa o número de unidades motoras ativas, frequência de disparo e a forma dos potenciais. (FORTI, 2005; BASMAJIAN e DE LUCA, 1985). Sendo desta forma um meio excelente na determinação da amplitude do sinal adquirido, através do método chamado de análise do domínio do tempo.

1.7 EXERCÍCIO E LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Em reabilitação várias técnicas são empregadas no tratamento de lesões nervosas, o exercício físico/terapêutico é uma delas. Os meios utilizados como forma de produzir uma atividade física são os mais variados. Desde treino em esteira, bicicleta e nado forçado, a treinos de força, submetendo uma determinada carga sobre a musculatura (UDINA *et.al.*, 2011; ILHA, 2007).

Há evidências de que o exercício possa acelerar o processo regenerativo, não surtir nenhum efeito sobre o processo, e até mesmo atrasá-lo. Corroborando com os resultados acerca dos efeitos benéficos do exercício no processo de regeneração nervosa, podemos citar

trabalhos de Udina e colaboradores (2011). Estes mostraram que há aumento na velocidade de crescimento dos axônios em ratos submetidos a uma atividade física regular (UDINA *et.al.*, 2011).

English e colaboradores (2009), ao seccionarem o nervo isquiático de ratos e aplicarem um programa de exercício de 2 semanas, 5 dias por semana, 1 hora por dia, concluíram que o exercício foi capaz de acelerar a regeneração dos axônios lesionados, o meio utilizado para o treino foi esteira motorizada (ENGLIS, *et.al.*, 2009).

Pesquisas mais atuais utilizando esteira e nado forçado como meio de promover o exercício, mostram o benefício do mesmo na regeneração nervosa. No entanto, concluem que se faz necessário uma maior investigação acerca dos parâmetros até que se possa extrapolar os resultados para o meio clínico (BOELTZ *et al.*, 2013; TEODORI *et.al.*, 2011; PINILLA *et.al.*, 2009; SABATIER, *et.al.*, 2008).

Estudos mostram que o aumento na velocidade de regeneração nervosa coincide com aumento na produção de fatores neurotróficos tais como BDNF, NGF e NT-3 (neurotrofina 3), importantes no processo regenerativo (VÖGELIN *et.al.*, 2006; MOLTENI *et.al.*, 2004; SKUP *et.al.*, 2002).

A explicação para que o exercício físico possa de alguma forma acelerar a regeneração nervosa baseia-se na proposta de que, durante o período de desnervação o exercício tem a capacidade de estimular as terminações aferentes dos músculos que estejam próximos ao local da lesão, estes por sua vez podem exercer algum estímulo em neurônios motores espinais através de conexões sinápticas que normalmente permaneceriam silenciosas (KOERBER *et.al.*, 2006).

Contrários a idéia de que o exercício exerça efeitos positivos durante a lesão nervosa, Gutmann e Jakoubek (1963), ao submeterem ratos que possuíam lesão por esmagamento do nervo isquiático ao nado forçado, mostraram retardo na maturação sináptica, concluindo que o exercício não é benéfico nas fases iniciais pós lesão nervosa (GUTMANN e JAKOUBEK, 1963). Essa idéia também foi compartilhada por outros pesquisadores tais como Soucy e colaboradores (1996) e Tam e colaboradores (2001), ambos mostrando que o exercício físico prejudica o brotamento de motoneurônios (TAM *et. al.*, 2001; SOUCY *et.al.*, 1996).

Parece haver um efeito inibitório causado pelo exercício sobre as células de Schwann, diminuindo sua habilidade de gerar pontes entre os brotamentos do neurônio e o músculo desnervado (TAM *et al.*, 2001).

Sobral e colaboradores (2008), ao submeterem ratos com lesão tipo axonotmese do nervo isquiático a um treino em esteira, na fase

inicial e tardia, por 20 minutos/dia, 5 vezes por semana durante 14 dias, concluíram que não houve influência do exercício no grau de funcionalidade do músculo reinervado, incremento no brotamento axonal ou aumento na velocidade de maturação das fibras nervosas (SOBRAL *et.al.*, 2008).

Não só a fase mas também a intensidade parece ser um parâmetro importante a ser observado, na fase inicial da lesão e de forma amena, o exercício poderia exercer efeito benéfico por acelerar a recuperação sensorio-motora, crescimento axonal e recuperação das propriedades contráteis do músculo. Enquanto, o exercício feito de forma forçada tende a ser prejudicial, especialmente se for realizado na fase inicial (VAN MEETEREN *et.al.*, 1997).

Pelo breve exposto é compreensível que mais trabalhos devam ser realizados para que se tenha certeza do real efeito do exercício físico perante uma lesão nervosa periférica em curso. Ao que parece, a linha tênue existente entre o efeito benéfico e maléfico causado pelo exercício durante a regeneração nervosa ainda não foi descoberta.

A aplicação de diversos meios de análise durante a experimentação pode facilitar o entendimento que nos falta a respeito deste tema.

1.8 RECUPERAÇÃO FUNCIONAL

A avaliação da regeneração nervosa em modelos experimentais através de análises morfológicas e eletrofisiológicas tem sido amplamente utilizadas, no entanto, os resultados obtidos a partir destes métodos podem não necessariamente estar relacionados a funcionalidade do nervo em questão (WOLTHERS *et.al.*, 2005). Embora estes parâmetros sejam úteis é importante conhecer o grau de recuperação funcional tanto em humanos quanto em animais (MONTE-RASO, 2006).

De Medinaceli e colaboradores em 1982, descreveram um método confiável para a avaliação do grau de recuperação nervosa funcional de ratos, utilizando medidas pré-estabelecidas das patas do animal durante a deambulação (MONTE-RASO, 2006). Este método foi chamado de índice funcional do isquiático (IFC). Para sua aplicação, é preciso que os animais caminhassem por uma passarela especial após terem suas patas marcadas com tinta (GRIFFIN *et.al.*, 2010).

A passarela contendo um papel quadriculado servia de registro para a impressão plantar, de onde as medidas foram retiradas e inseridas na fórmula para o cálculo do IFC.

Com o passar do tempo outras técnicas foram desenvolvidas para a obtenção da impressão plantar dos animais, a captura de imagem em tempo real através da filmagem foi um grande avanço. Uma vez registradas em vídeos as medidas podiam ser retiradas e calculadas mais facilmente e com maior fidedignidade (GASPARINI, *et.al.*, 2007).

O IFC baseia-se no fato de que lesões do nervo isquiático em ratos levam a diminuição da flexão plantar, diminuição do espalhamento dos artelhos e tendência ao arrastamento da pata posterior, (VAREJÃO *et.al.*, 2001; BAIN, *et.al.*, 1989).

2 JUSTIFICATIVA

A realização deste trabalho justifica-se pelo fato de que ainda existem inúmeras informações controversas a respeito do tema, as várias formas de análise nem sempre se correlacionam, dificultando a interpretação dos resultados. Buscou-se através deste trabalho o acréscimo de mais dados a respeito dos efeitos do exercício físico sobre o processo de regeneração nervosa periférica, utilizando diversas formas de análise.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os possíveis efeitos de três diferentes rotinas de exercício físico sobre o processo de regeneração nervosa periférica em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Averiguar a recuperação funcional da marcha dos ratos ao longo do processo de experimentação.
2. Verificar e comparar as diferentes repercussões eletromiográficas provenientes dos músculos gastrocnêmios dos animais ao longo do processo de experimentação.
3. Quantificar a expressão gênica dos fatores neurotróficos, BDNF, NGF, da enzima iNOS e do fator TNF- α , provenientes de amostras dos nervos lesionados ao final da experimentação.
4. Analisar o aspecto morfológico do músculo gastrocnêmio, e dos cotos proximal e distal do nervo lesionado ao final da experimentação.
5. Comparar e correlacionar as diversas variáveis (funcionais e eletromiográficas) com os demais dados obtidos (biomoleculares e histológicos).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pela comissão de ética em utilização de animais da Universidade Regional de Blumenau – FURB, sob o protocolo n° 017/2008 (CEUA-FURB).

4.1 AMOSTRA

A amostra foi constituída no total de 48 ratos Wistar machos adultos, com peso entre 250 a 350 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Regional de Blumenau.

O rato foi selecionado para o exeperimento devido ao nosso modelo de lesão nervosa aplicar-se a este animal, além de sua habilidade inata de nadar.

Durante o processo de experimentação os animais permaneceram no biotério setorial do laboratório de Fisioterapia neurológica experimental da universidade alojados em gaiolas individuais dentro de uma estante ventilada, recebendo de forma livre água pura e ração sólida da marca Nuvilab[®], as gaiolas foram higienizadas duas vezes na semana nos mesmos horários.

Os animais foram submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12 horas (7:00 hs às 19:00 hs), permanecendo no ambiente com temperatura controlada de 23° com variações de 2° para mais ou para menos.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL E PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Os animais foram divididos em 4 grupos (12 animais por grupo), os experimentos foram feitos com cada grupo de forma individual 12 animais por vez.

Após serem encaminhados pelo biotério ao laboratório, todos os animais permaneceram por um período de 10 dias para ambientação onde realizou-se o treino dos mesmos na passarela do IFC. No décimo primeiro dia era executou-se a cirurgia para a lesão do nervo isquiático direito e implantação dos eletrodos nos músculos gastrocnêmios para a aquisição do registro eletromiográfico.

A divisão dos grupos realizou-se da seguinte maneira:

O grupo 1 (G1/controle, n=12) foi constituído de animais sedentários, permaneceram 21 dias sem praticar nenhum tipo de atividade.

O grupo 2 (G2, n=12) realizou nado forçado 24 horas após a lesão durante 21 dias consecutivos, 45 minutos por dia.

O grupo 3 (G3, n=12) realizou nado forçado 7 dias após a lesão durante 14 dias consecutivos, por 45 minutos dia.

O grupo 4 (G4, n=12) realizou nado forçado 24 horas após a lesão dentro de um período de 21 dias alternados dia sim, dia não, 45 minutos por dia.

Para o nado utilizou-se um recipiente de plástico com dimensões de 33 cm de largura por 54 cm de comprimento e 35 cm de profundidade, o recipiente foi dividido ao meio através de uma placa de alumínio de maneira que dois animais pudessem nadar simultaneamente e de forma individualizada (Figura 7). Este recipiente de treino através da natação é utilizado como rotina em nosso laboratório.

Antes da imersão dos animais, a água era aquecida a uma temperatura de 34°, esta temperatura era monitorada durante todo o processo de treinamento.



Figura – 7: Recipiente utilizado em nosso laboratório para promover nado forçado dos animais.

4.3 LESÃO EXPERIMENTAL E IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS

4.3.1 Confecção dos eletrodos

Para a captação do sinal é necessário o uso de eletrodos, estes dispositivos são a interface entre o corpo e o equipamento e precisam ser posicionados o mais próximo possível do músculo para que possam captar sua corrente iônica (MARCHETTI e DUARTE; 2006). Os eletrodos podem ser do tipo agulha para registro intramuscular, ou eletrodos de superfície colocados sob a pele do músculo a ser registrado (WU *et.al.*, 2013).

Utilizou-se eletrodos fabricados em nosso laboratório. Foram usados fios elétricos de 2mm de espessura. Uma das extremidades era desencapada e unida através de estanho em um fio condutor especial constituído essencialmente de liga de Níquel cromo (Ni 70% Cr 30%). Antes do processo de soldagem as extremidades foram embebecidas em ácido fosfórico para garantir a retirada de impurezas e do isolamento restante.

Uma vez unidas as extremidades, o ponto de solda era envolto com um pequeno pedaço de tubo plástico proveniente de sonda uretral, as aberturas do tubo foram fechadas com auxílio da resina epóxi araldite da marca Hobby®, (Figura 8).

Após a secagem da resina os eletrodos foram testados através de um multímetro da marca Minipa® modelo ET – 1400. O teste tinha como objetivo garantir que houvesse a passagem de corrente. Eletrodos que não apresentaram passagem de corrente foram descartados de imediato.

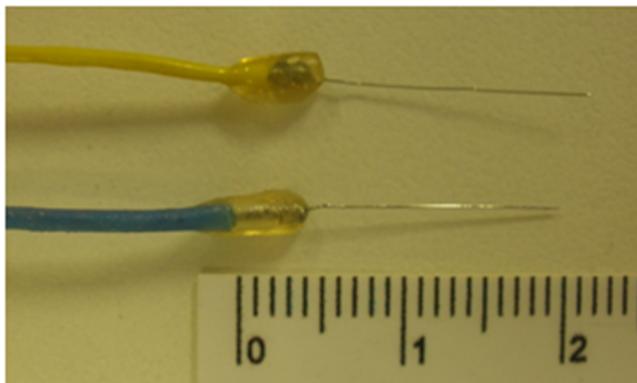


Figura – 8: Eletrodos confeccionados em nosso laboratório

4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados de forma intraperitoneal com uma dose fixa de 0,1 ml de cloridrato de xilidrina (Rompun, Bayer[®]) e uma dose de cloridrato de cetamina (Ketamin, Cristália[®]), 0,3 ml/100g (75mg/Kg).

Após averiguação da profundidade da sedação através do pinçamento da cauda e das patas do animal realizava-se a tricotomia da região dorso – lateral da coxa direita, esquerda e dorso imediatamente posterior ao pescoço. Os animais foram então colocados em decúbito ventral na bancada com as patas posteriores fixas através de fita crepe para que houvesse melhor segurança nas incisões, (Figura 9A).

Antes das incisões o campo cirúrgico dos membros e do dorso era limpo com antisséptico Polvinil pirrolidona iodo (PVPI), marca Nordiodine[®], a fim de evitar problemas com infecção. Inicialmente realizou-se a incisão na pele da face dorso – lateral da coxa direita com auxílio do bisturi até a visualização da musculatura infrajacente, a pele era suavemente descolada da fáscia muscular, procedia-se então com a separação dos músculos bíceps femoral e semitendíneo através da tesoura cirúrgica até a visualização do nervo isquiático.

Com o objetivo de produzir uma lesão nervosa tipo axonotmese foi executado o pinçamento do nervo em seu ponto médio antes da bifurcação em nervo tibial e fibular comum. Para tanto utilizou-se uma pinça hemostática durante 30 segundos cronometrados.

Neste período de tempo a cremalheira da pinça permanecia travada no terceiro nível, (TAMADDONFARD *et.al.*, 2012).

Uma vez produzida a lesão nervosa no membro direito, procedia-se com a implantação dos eletrodos. A extremidade condutora era implantada no músculo gastrocnêmio através de uma agulha hipodérmica (BD[®]) curva, esta servia como guia para a entrada do fio no músculo, a agulha atravessava o gastrocnêmio e o fio atravessava através dela. A porção livre do fio condutor era dobrada para servir de gancho evitando que o fio escapasse do músculo durante os movimentos do animal. Para maior fixação a interface fio condutor – fio elétrico revestida de araldite era suturada no músculo bíceps femoral. O mesmo procedimento era realizado no membro posterior esquerdo.

Os Fios elétricos provenientes das patas posteriores direita e esquerda foram guiados em separado através do dorso do animal por uma sonda de lipoaspiração que era deslocada entre a pele e a fáscia muscular. Esta sonda saía em uma incisão no dorso previamente realizada aproximadamente 4 cm atrás do pescoço conforme descrito por Kim e colaboradores (2013). A figura – 9B mostra o animal já com os fios transpassados através da fáscia.

O excesso de fio era então cortado e as extremidades foram desencapadas e soldadas com estanho a um conector com capacidade para o encaixe de quatro pinos. Os dois primeiros pinos destinados ao aterramento foram orientados de modo que fossem fixados no sentido anterior, o terceiro e o quarto pino serviam para a soldagem dos fios provenientes do membro direito e esquerdo respectivamente.

A porção soldada recebia uma cobertura de acrílico autopolimerizante da marca Jet[®] como meio de isolar a parte metálica dos demais tecidos, (Figura 9C).

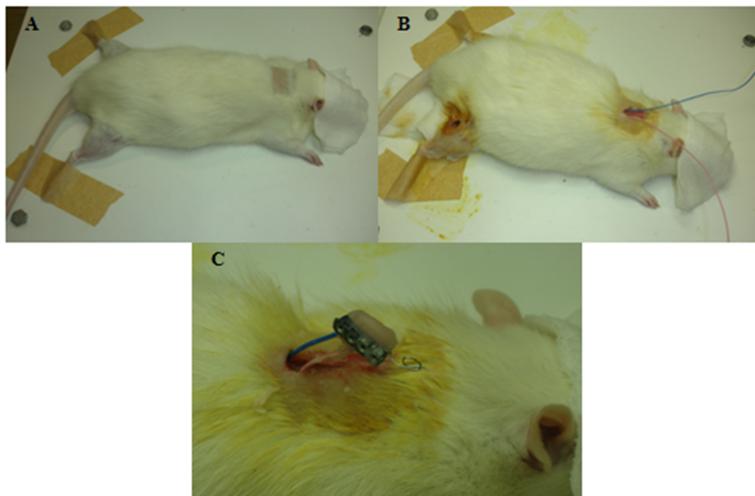


Figura – 9: A) Posição do animal na bancada para realização da cirurgia. B) Eletrodos implantados em ambos os gastrocnêmios, os fios atravessam inferiormente a pele do animal e saem na região dorsal. C) Fios soldados ao conector no dorso do animal, notar as extremidades metálicas cobertas de acrílico.

Após a secagem do acrílico, o conector era adaptado ao animal com as extremidades soldadas recobertas de acrílico voltadas para baixo. Para a fixação final e fechamento do espaço entre a pele e o conector utilizou-se mais uma vez acrílico autopolimerizante.

Por fim, a pele onde foram realizadas as incisões foram suturadas com fio de nylon monofilamento 3-0, a região recebia a aplicação tópica de antibiótico e anti-inflamatório, (Neotopic[®]). O animal era então recolocado em sua gaiola para recuperação.

4.5 ANÁLISE FUNCIONAL

Para a análise funcional utilizamos a fórmula do IFC, que é uma modificação realizada por Bain em 1989 sobre a fórmula original descrita por De Medinaceli em 1982. Este índice reflete o grau de funcionalidade motora através da análise matemática comparativa entre a pata normal e a pata lesionada. As seguintes medidas são mensuradas para a obtenção do resultado final: Comprimento total da pegada, consiste na distância do calcâneo do animal até o terceiro dedo, esta medida é dependente da ativação do músculo gastrocnêmio e sóleo, largura total da pegada, é a medida do 1° ao 5° dedo, e largura média da pegada, é a medida do 2° ao 4° dedo, ambas as medidas anteriores dependem da ativação da musculatura intrínseca plantar, (NAGAO *et.al.*, 2011). A figura – 10 mostra as três medidas utilizadas para o cálculo do IFC.

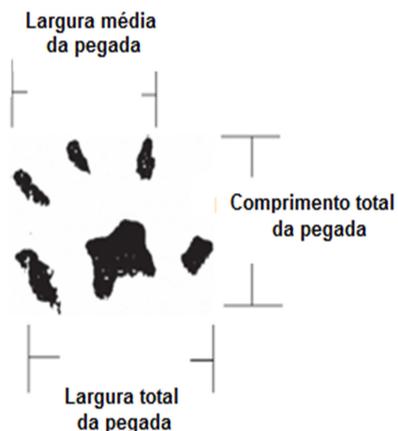


Figura – 10: Impressão plantar de rato e medidas utilizadas no cálculo do IFC, (Modificado de AMAKO e NEMOTO, 1998).

O valor gerado após inserção dos dados na fórmula pode variar de positivo a negativo, sendo que zero ou valores positivos representam a função normal e valores negativos a disfunção, chegando até -100, disfunção máxima (LEONI *et. al.*, 2012).

A fórmula de Bain prevê medidas específicas para o nervo isquiático e seus ramos (tibial e fibular), através da análise de lesões isoladas e combinadas, atribuindo-se um valor de importância a participação de cada nervo na inervação da pata de maneira que a fórmula final representada na Figura – 11, agrupa todos os ramos do nervo isquiático (VEAS; 2009).

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

Figura – 11: Fórmula para o cálculo do IFC modificada por Bain *et. al.* em 1989, onde, E = Pata experimental, N = Pata normal, (VAREJÃO *et. al.* 2001).

O índice consiste na análise da deambulação do animal em uma passarela de madeira com as seguintes medidas: 45cm de comprimento, 9cm de largura e 30 cm de altura. A passarela possui um fundo cego escuro em uma das extremidades para onde o animal é atraído, o piso é de acrílico gradeado com intervalos de 1cm por 1cm, que servem de referência para as medições. A baixo deste piso existe um espelho posicionado em 45° que permite a visualização do animal. A Figura – 12 apresenta a passarela utilizada em nosso laboratório com as medidas descritas previamente.



Figura – 12: Passarela do IFC utilizada em nosso laboratório.

Para que os cálculos pudessem ser realizados, realizamos registros em vídeo que permitiam aquisição de imagens das pegadas das patas posteriores dos animais. Tais registros ocorriam enquanto os animais atravessavam a passarela.

Utilizamos uma filmadora marca Sony® Handycam DCR – SR 45, que permanecia fixa em um tripé a 60cm de distância da passarela. A câmera era focalizada de maneira que ficasse de frente para o espelho da passarela, (Figura – 13).

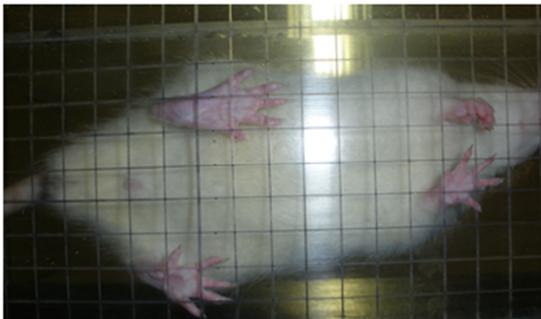


Figura – 13 Rato na passarela do IFC, vista inferior.

Os vídeos foram feitos em alta definição, formato de tela de 16:9, resolução de 490.000 pixels, e arquivados no computador de nosso laboratório no formato WMV (Windows media vídeo).

As aquisições foram realizadas nos períodos de, 24 horas pós – lesão, 7º dia pós – lesão, 14º dia pós – lesão e 21º dia pós – lesão. A análise foi feita através do software Image – J® onde de cada vídeo se capturavam imagens estáticas de dois momentos, o primeiro, quando o animal apoia o peso na pata posterior direita lesionada, e o segundo, quando apoiava na pata posterior esquerda sadia.

As variáveis comportamentais do IFC foram extraídas através do software Image – J® e inseridas na fórmula, (Figura – 11), previamente montada no software Microsoft Excel®, uma vez realizado o cálculo os dados foram transferidos para planilha do software Statistica® versão 8.0 onde foram processados através da ANOVA de uma via, aplicou-se o teste de Levene para homogeneidade de variâncias, e em seguida, o teste de Tukey caso houvesse significância. Os resultados foram apresentados através de 8 gráficos, quatro contendo

a evolução de cada grupo ao longo do processo de experimentação, e quatro com as comparações dos valores de cada grupo por período. Assumiu-se o valor de p como sendo $< 0,001$

4.6 ANÁLISE ELETROMIOGRÁFICA

A captação do sinal eletromiográfico foi feita através do sistema de aquisição de sinais biológicos marca BIOPAC[®] MP – 150 acoplado a dois módulos pré – amplificadores do mesmo fabricante (BIOPAC[®] EMG – 100C). Estes por sua vez, ligados a um microcomputador da marca DELL[®], o qual possui o software ACQ – Knowledge 4.2[®], utilizado para registrar e arquivar o sinal. A figura 14A mostra o equipamento utilizado em nosso laboratório.

O sinal bruto proveniente dos membros posteriores direito e esquerdo foram registrados simultaneamente, além da média Root mean square (RMS), ou valor quadrático médio, que consiste na medida estatística da magnitude de uma grandeza (Figura – 14B).

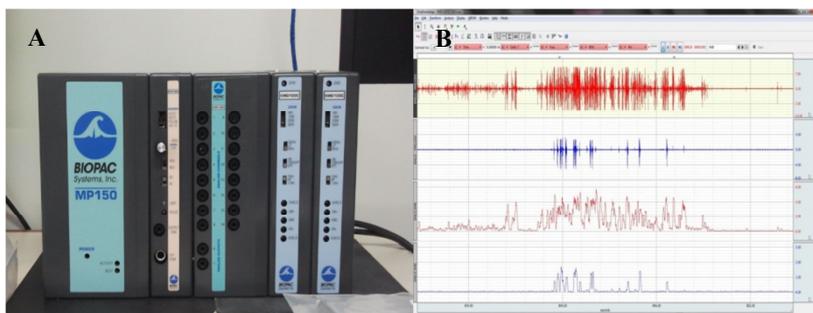


Figura – 14: A. Equipamento utilizado na captação do sinal, Biopac[®] modelo MP – 150 acoplado a dois pré – amplificadores EMG – 100 C. B. : Imagem do monitor durante registro, notar os dois traçados superiores (sinais brutos) e os dois traçados inferiores (média RMS).

Como o sinal captado no tecido é um sinal analógico (contínuo no tempo), este deve ser convertido para um sinal digital, podendo assim ser registrado pelo computador. Para isso, se faz preciso ajustar alguns parâmetros tais como, frequência da amostragem, uso ou não de filtros, conversores analógicos-digitais, entre outros (MARCHETTI e

DUARTE; 2006). Os registros foram realizados utilizando os valores mostrados na tabela 1. O tempo de aquisição do sinal foi de 20 minutos, durante este tempo o animal permanecia em uma caixa de alumínio com dimensões de 32 cm de largura, 42 cm de comprimento e 34 cm de altura, (Figura – 15). A caixa possui uma abertura superior por onde os fios do conector foram acoplados ao animal permanecendo suspensos, a porção anterior é revestida parcialmente por uma placa de acrílico de modo a permitir a visualização do animal por completo. A caixa permanecia ao lado do eletromiógrafo de frente para o examinador, de maneira que este pudesse acompanhar os comportamentos do animal e monitorar a aquisição do sinal.

Tabela – 1: Configuração do módulo pré-amplificador e do software para a aquisição dos sinais eletromiográficos. FONTE: Manual do fabricante

Parâmetro	Valor
Voltagem de entrada (ganho)	1000 mV
Filtro passa – baixa	200 Hz
Filtro passa – alta	10 Hz
Taxa de amostragem	250 Hz
Constante de tempo	5 segundos
Filtro Notch	50 dB rejeição



Figura – 15: Caixa onde o animal permanecia durante o registro.

Por intermédio de um recurso do software ACQ – Knowledge 4.2[®], marcações foram feitas para identificar os seguintes comportamentos: Quando o animal deambulava, ficava de pé sobre as duas patas posteriores ou, praticava autolimpeza. Ao término do tempo de registro esse sinal era arquivado para posterior análise.

Do tempo total de 20 minutos de registro, uma janela de 8 segundos foi separada de cada trecho para facilitar a visualização do traçado, esta janela possuía o comportamento referente a deambulação do animal.

Primeiramente os traçados foram ampliados até que fosse possível visualizar a forma dos potenciais de ação. A observação destes, é um meio fácil porém valioso indicativo da qualidade da inervação do músculo, pela simples diferenciação entre os padrões de onda tipo monofásico, bifásicos, trifásicos e polifásicos.

Os registros do 1^o, 7^o, 14^o e 21^o dia pós – lesão foram avaliados de forma qualitativa através da observação, caracterização e descrição do sinal. Utilizou-se o método de análise do domínio temporal que descreve quando ocorre o evento e qual a amplitude desta ocorrência dada em milivolts (mV), a amplitude é um indicador da magnitude da atividade muscular, que se dá pelo aumento no recrutamento das unidades motoras (MARCHETTI e DUARTE, 2006; ROBERTSON, 2004). A média RMS foi utilizada nesta análise para expressar a magnitude do sinal em função do tempo uma vez que, como descrito anteriormente, além do registro do sinal bruto o registro convertido em RMS também era realizado de forma simultânea.

Devido a dificuldade de se conseguir sinais claros ao final do experimento em consequência de problemas de ordem técnica causados

pelo implante crônico nos animais, optou-se por utilizar um animal em cada grupo para caracterização dos períodos.

4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Após a retirada do músculo gastrocnêmio direito e nervo isquiático direito, os mesmos foram colocados em recipiente contendo formaldeído a 10%. Ao término do tempo de fixação realizou-se a desidratação do tecido em banhos de álcool e xilol através do aparelho histotécnico da marca Oma[®], modelo DM-40.

Uma vez desidratadas, as amostras passaram pelo banho de parafina a 60° C onde então foram enblocados em cassetes com parafina para posterior corte em micrótomato rotativo marca Microm[®] HM 325. Para os cortes transversais utilizou-se a espessura de 5 micrômetros tanto para os músculos quanto para os nervos.

Feita a montagem dos tecidos nas lâminas, usou-se para a coloração hematoxilina e eosina para os músculos e Giemsa[®] para os nervos.

A análise das lâminas se deu através de microscópio óptico marca Zeiss[®] modelo Axiostar Plus, acoplado em uma câmera fotográfica digital Canon[®] Power Shot A640, resolução de 10.0 Megapixels, através da lente Carls Zeiss[®] 426126.

Na análise buscou-se a observação das lâminas e descrição das características morfológicas do tecido.

4.7 ANÁLISE BIOMOLECULAR

O Epicentro da lesão nervosa foi retirado e processado para análise da expressão gênica dos fatores neurotróficos BDNF, NGF, da enzima iNOS e da citocina TNF- α .

A análise foi feita através da técnica de reação de polimerização de cadeia em tempo real (RT-PCR), esta combina a amplificação da PCR com detecção fluorescente automatizada.

Para a extração do RNAm foram realizadas as seguintes etapas adaptadas conforme orientação do protocolo que acompanha o produto Brazol[®], que é o reagente fundamental utilizado na técnica para extração de ácidos nucleicos e proteínas.

O epicentro da lesão foi separado das demais partes do nervo e macerado com bisturi estéril, o material foi então colocado em um microtubo tipo eppendorf de 1,5 ml onde foi adicionado 0,500 ml de

Brazol[®]. Após, o tubo foi agitado com o auxílio do Vortex por aproximadamente 2 minutos a fim de garantir a homogeneização. Ao término deste processo foi feita adição de 0,125 ml de clorofórmio gelado com o intuito de separar a porção orgânica da aquosa, o material foi então misturado com vórtex por mais dois minutos, onde então seguiu para a centrifuga marca Vision[®] por 20 minutos na velocidade de 12.000 rpm com temperatura de 4°C.

Terminada a primeira centrifugação, a camada superior aquosa contendo o RNAm foi retirada e transferida para um tubo eppendorf estéril onde recebeu a adição de 0,250 ml de isopropanol. O material permaneceu incubado por 10 minutos até a segunda centrifugação em velocidade de 12.000 rpm, 4°C durante 10 minutos.

Ao final da segunda centrifugação o isopropanol foi desprezado, realizou-se a adição de 0,500 ml de etanol a 70%, os tubos foram novamente centrifugados em velocidade de 7.500 rpm durante 5 minutos com temperatura de 4°C.

Com o término da terceira centrifugação, o etanol foi descartado e os tubos colocados deitados com a tampa aberta na estufa de secagem. Após 10 minutos de secagem sob temperatura de 40° C, adicionou-se 100 microlitros de água livre de RNAses (Gibco[®]) e condicionamento do material em freezer com temperatura de -80° C.

Para que a técnica de RT-PCR seja executada com sucesso, precauções rigorosas são essenciais e devem ser adotadas a fim de evitar resultados falso-positivos e falso- negativos.

É necessário garantir a ausência ou minimizar o máximo possível a contaminação do material a ser manuseado. Todos os procedimentos foram feitos utilizando ponteiros descartáveis, luvas estéreis bem como o transporte e incubação dos microtubos feitos dentro de um banho de gelo. Os manuseios foram todos realizados com auxílio da câmara de proteção biológica com fluxo laminar a fim de evitar perda de material.

Após estes procedimentos realizou-se a segunda bateria da técnica RT-PCR, sendo utilizado o aparelho de detecção de sequência StepOne[®] (Applied Biosystems, EUA). O sistema de detecção utilizado para quantificação da expressão de RNAm foi o SYBR Green (Applied Biosystems, EUA). Neste sistema, a molécula de SYBR Green interage com a fita dupla de DNA amplificada pela PCR, e emite uma fluorescência quando excitada por lâmpada de tungstênio-halogênio. Esta fluorescência é captada pelo aparelho de detecção, o processo de excitação-captação de fluorescência é realizado em cada ciclo de

amplificação da PCR, fornecendo uma quantificação em tempo real das seqüências dos genes-alvo.

A reação de PCR em tempo real foi realizada da seguinte maneira: 1,0 µl de cDNA, foram adicionados 0,5 µl de oligonucleotídeo iniciador sense (10 µM), 0,5 µl de oligonucleotídeo iniciador anti-sense (10 µM), 7,5 µl de Master Mix 2X (Applied Biosystems®) e água suficiente para 15 µl de reação. As amostras foram então incubadas a 95°C por 10 min, e passaram por 40 ciclos de incubações a 95°C por 15 segundos, e a 56°C por 45 segundos. Os oligonucleotídeos utilizados (Sigma-Aldrich, EUA) para a PCR foram:

GAPDH: Primer anterior 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' e Primer reverso 5'-GCCCCACGGCCATCA-3'.

BDNF: Primer anterior 5'-ATGCTCAGCAGTCAAGTGCCTTTGG-3' e Primer reverso 5'-GCCGAACCCTCATAGACATGTTTGC-3'.

NGF: Primer anterior 5'-ACCCAAGCTCACCTCAGTGTCTGG-3' e Primer reverse 5'-CATTACGCTATGCACCTCAGAGTGG-3'.

iNOS: Primer anterior 5'-AAAGACCAGGCTGTCGTTGA-3' e Primer reverse 5'-ACGGGACCGGTATTCATTCT-3'.

TNF- α : Primer anterior 5'-AAATGGGCTCCCTCTATCAGTTC-3' e Primer reverso 5'-TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'.

A quantificação de RNAm foi feita como um valor relativo a uma referência interna, o RNAm do GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), cuja expressão pode ser considerada inalterada nas condições experimentais.

Os valores quantitativos de expressão do RNAm dos genes alvo e do GAPDH foram obtidos de um limiar arbitrário de fluorescência, analisado na fase exponencial da curva de amplificação, sendo o ciclo limiar (Ct) calculado. Foram calculados os Cts de cada amostra, em cada reação, para os quatro genes. Foi calculado o Ct médio de cada amostra, e o cálculo de expressão relativa foi feito através da subtração deste Ct médio do gene em estudo do Ct médio do gene GAPDH, obtendo-se o Δ Ct.

Como não é usual a utilização da expressão relativa de um determinado gene em valores de Δ Ct, em seguida foi realizada a normalização do Δ Ct de cada grupo em estudo com o Δ Ct do grupo 1 (controle), devido às suas características logarítmicas de amplificação, foi determinado então o parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para análise de expressão relativa do RNAm dos genes em estudo, que foi representado em nosso experimento, como mudança relativa em relação a um grupo controle.

Foram selecionadas 5 amostras de cada grupo para compor a média, a análise estatística e a construção dos gráficos se deu através do

software GraPhapad Prism[®] 5.0, utilizou-se a ANOVA de uma via seguido do teste de variância de Barlett e do teste de Newmann – Keuls para comparação entre os grupos, os valores de p assumidos foram < 0,05, 0,1 e 0,01.

5 RESULTADOS

5.1 IFC

A coleta dos dados do IFC ocorreram nos períodos de 1,7,14 e 21° dia após a lesão nervosa.

É importante destacar que os valores do IFC foram obtidos com base na média de 9 animais por grupo, embora os experimentos fossem conduzidos inicialmente com 12 animais. Isso se deu devido a perda de alguns animais ao longo do processo de experimentação em um dos grupos, desta forma optou-se por diminuir o número de animais dos demais grupos, mantendo assim o número de animais igual para todos os grupos. A exclusão dos animais para este nivelamento foi feita de forma aleatória.

A figura 16 mostra os quatro gráficos referentes a evolução de cada grupo ao longo do processo de experimentação.

Em relação ao grupo controle (sedentário), é possível constatar um leve aumento nos valores do IFC do 7° para o 14° dia, sem diferença significativa, no entanto, do 14° ao 21° dia os valores aumentam drasticamente onde é possível constatar diferença estatística significativa contra os dias anteriores, (valor de ANOVA $F(3, 32) = 10,02$, $p < 0,001$)

O grupo 2 mostra avanço em todos os períodos, a diferença significativa se deu no 14° dia contra o 1° e 7° dia e no 21° dia também contra o 1° e 7° dia, não houve diferença estatística entre o 14° e 21° dia (valor de ANOVA $F(3, 32) = 18,67$, $p < 0,001$)

O grupo 3 mostra um padrão semelhante ao grupo 2, a diferença estatística se deu no 14° dia contra o 1° e 7° dia, já no 21° dia houve diferença significativa contra todos os demais períodos, 1°, 7° e 21° dias, (valor de ANOVA $F(3, 32) = 39,56$, $p < 0,001$).

No grupo 4 também observa-se evolução nos valores de IFC, com diferença estatística já no 7° dia comparado ao 1°, o 14° apresenta diferença também contra o 1° dia enquanto o 21° dia apresenta diferença contra todos os outros, (valor de ANOVA $F(3, 32) = 20,16$, $p < 0,001$).

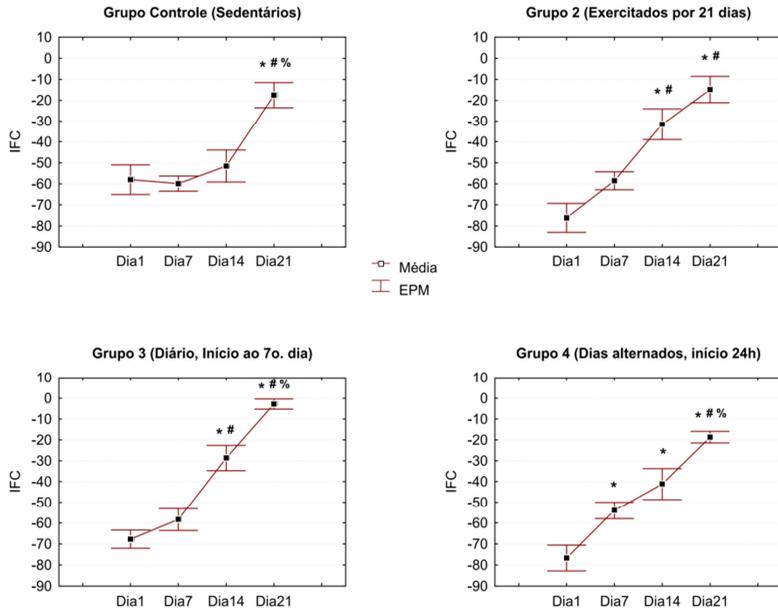


Figura – 16: Valores do Índice Funcional do Ciático (IFC) dos diferentes grupos ao longo de 21 dias de experimentação. (*) Diferenças significantes em relação ao primeiro dia pós-axonotmese; (#) Diferenças significantes em relação ao sétimo dia pós-axonotmese; (%) Diferenças significantes em relação ao décimo quarto dia pós-axonotmese. $p < 0,001$.

A figura 17 apresenta a comparação dos valores de IFC entre os grupos em cada período de análise.

É possível constatar no período de 24 horas após a lesão que não houve diferença estatística entre os grupos, fato esperado devido a lesão ser feita de forma uniforme em todos os animais.

No período de 7 dias após a lesão observa-se uma tendência positiva nos grupos exercitados (2,3 e 4), porém não há diferença estatística.

O gráfico referente ao período de de 14 dias após a lesão mostra o grupo 2 e 3 com diferença estatística em relação ao grupo controle, não há diferença entre eles, o grupo 4 mantém valores de IFC mais positivos em relação ao controle porém sem diferença estatística, (valor de ANOVA para o período de 14 dias após a lesão $F(3, 32) = 10,09$, $p < 0,01$).

No 21º dia após a lesão é possível constatar diferença estatística apenas no grupo 3 contra o controle, (Valor de ANOVA $F(3, 32) = 12,39$, $p < 0,01$).

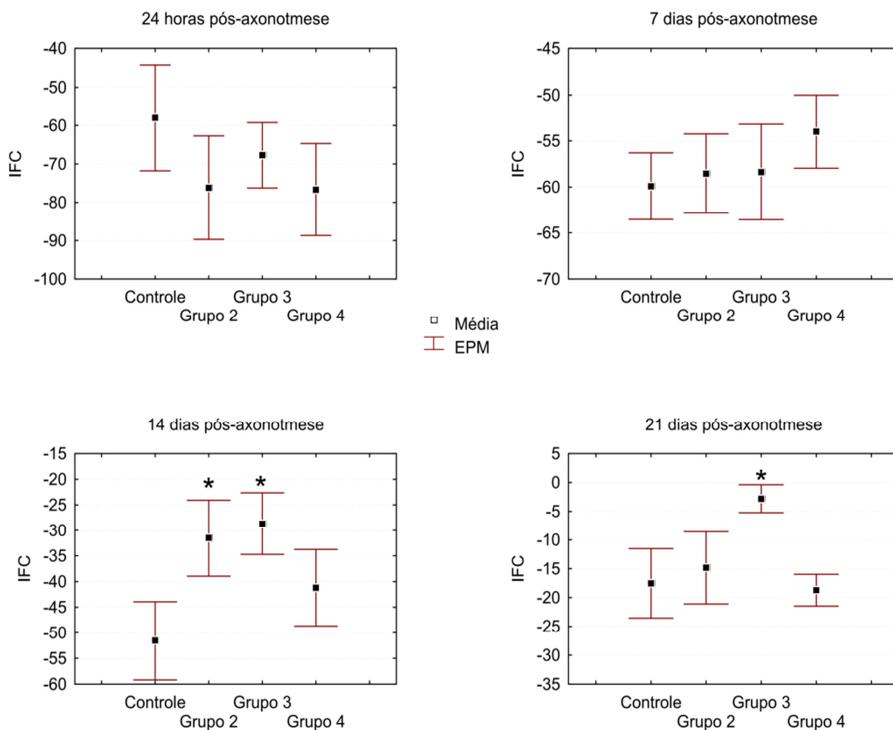


Figura – 17: Valores comparativos do Índice Funcional do Ciático (IFC) dos diferentes grupos durante os quatro momentos da coleta dos dados pós-axotomese. Grupo 2 – exercitados diariamente durante 21 dias; Grupo 3 – exercitados diariamente com início ao sétimo dia pós-axotomese; Grupo 4 – exercitados em dias alternados com início 24 horas após axotomese. (*) Diferenças significantes em relação ao grupo controle. $p < 0,01$.

5.2 ANÁLISE DO SINAL ELETROMIOGRÁFICO

Conforme descrito nos materiais e métodos, escolhemos um animal para cada período que possui-se o melhor traçado para a descrição. Essa escolha se deu através de um processo minucioso de exclusão de sinais não apropriados para a análise, visto que, durante o período de aquisição, os comportamentos do animal foram marcados, para a análise, escolhemos as marcações que foram referentes ao

período de deambulação do animal, esta porção foi então retirada do traçado original para descrição de suas características.

Os resultados serão apresentados por períodos de aquisição, em cada período será descrito o que foi observado no registro do animal escolhido para cada grupo, a descrição fará referência a figura correspondente de cada animal/grupo que virá logo após o texto, cada figura conterá quatro elementos, dois traçados brutos provenientes dos membros posteriores direito e esquerdo, e suas respectivas versões registradas via RMS. Cada traçado na figura é constituído de um período total de 8 segundos.

Os traçados em RMS nos ajudarão a visualizar melhor eventos que acontecem no traçado bruto. Como exposto na introdução, o sinal bruto convertido em RMS representa uma das melhores formas de se determinar a amplitude do sinal adquirido.

O pico da amplitude tanto no sinal bruto como no RMS será observado e descrito.

Neste texto daqui em diante faremos referência ao membro posterior direito chamando-o de experimental, e, o membro posterior esquerdo será denominado de sadio.

Inicialmente serão descritas as características gerais encontradas na maioria dos traçados durante os tempos de aquisição.

Uma característica comum na maioria dos sinais provenientes do membro posterior experimental foi a presença de atividade espontânea na forma de fibrilações e fasciculações durante o período em que o animal encontrava-se em repouso. Separamos alguns traçados aleatórios contendo estes fenômenos de forma a apresentar a característica em que estes se mostram em nossos traçados, iremos observar na figura seguinte estes potenciais como vistos no sinal bruto, sua forma quando convertidos em RMS e uma ampliação do sinal bruto mostrando sua morfologia de forma mais aproximada.

A figura 18 mostra tais fenômenos. Observa-se na figura 18 A um trecho com período total de 8 segundos em que o animal encontra-se em repouso, o traçado é marcado por potenciais de fasciculação mostrados pelas setas na figura, tais potenciais em geral caracterizam-se por apresentar grande amplitude e curta duração.

Na figura 18 B, o mesmo traçado da figura 18 A é mostrado, porém agora convertido em RMS, esta conversão nos ajuda a entender melhor a morfologia deste fenômeno. Lembramos que a conversão do sinal bruto para o RMS torna os valores todos positivos, por isso observamos apenas picos, sem valores negativos.

Na figura 18 C a escala foi ampliada de forma a evidenciar melhor apenas um potencial de fasciculação do sinal bruto, retirado da figura 18 A tal figura mostra um período total de 0,50 segundos de aquisição. A seta indica tal potencial no traçado sucedido de um longo período de silêncio, caracterizado pelo repouso sem nenhum fenômeno espontâneo. Observa-se a morfologia polifásica deste sinal.

Na figura 18 D apresentamos os potenciais de fibrilação convertidos em RMS, estes aparecendo de forma mais regular que os de fasciculação. Observa-se nesta figura um traçado de 8 segundos contendo o período de repouso do animal e potenciais de fibrilação ocorrendo de forma sucessiva mostrados pelas setas na figura.

A figura 18 E mostra o traçado da figura 18 D ampliado em um tempo total de 0,50 segundos, onde observa-se a regularidade em que os potenciais de fibrilação aparecem, (setas da figura 18 E).

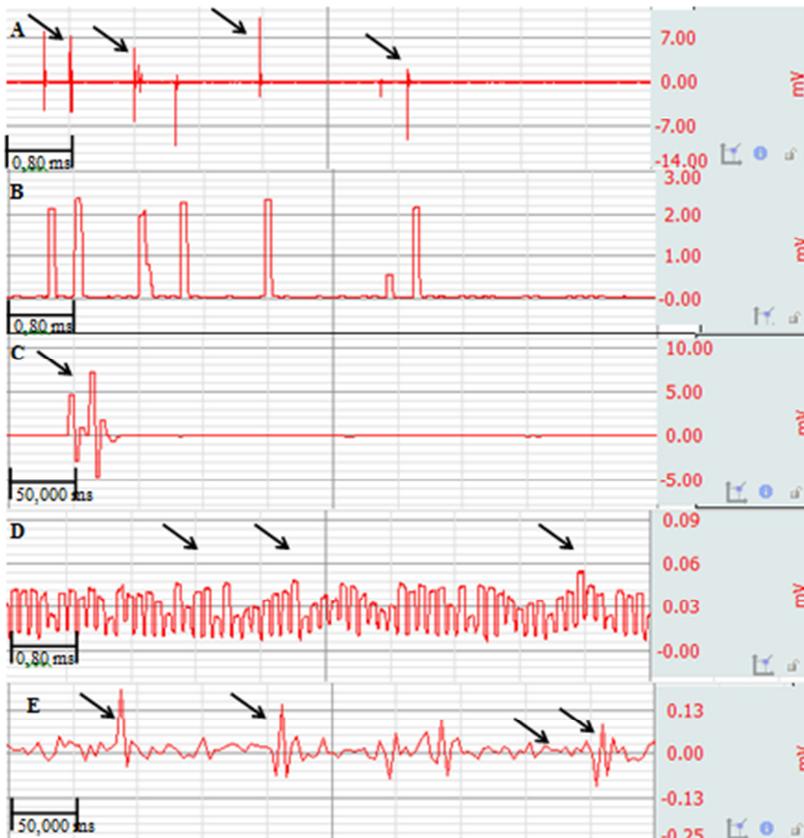


Figura – 18: Sinais eletromiográficos referentes a pata experimental. A) Trecho total de 8 segundos mostrando potencias de fasciculação (setas), barra horizontal de 80 milissegundos. B) Mesmo trecho do traçado A, convertido em RMS, barra horizontal de 80 milissegundos. C) Um potencial de fasciculação retirado do traçado A, observar característica polifásica (seta), barra horizontal de 50,000 milissegundos, tempo total do traçado de 0,50 segundos. D) Registro bruto de 8 segundos mostrando potencias de fibrilação (setas). E) Potencias de fibrilação convertidos em RMS, tempo de 8 segundos. E) Ampliação do sinal bruto visto na figura D, setas mostram potencias de fibrilação, tempo total de registro de 0,50 segundos, barra horizontal de 50,000 ms.

5.2.1 Vinte e quatro horas pós – lesão

A figura 19 mostra os traçados eletromiográficos do rato do G1 (controle, sedentário), no período de 24 horas pós – lesão.

Nota-se na figura 19 A um trecho de 8 segundos de sinal bruto da pata experimental onde não se observa nenhum tipo de atividade espontânea, e nem mesmo contração muscular. Na figura 19 B o mesmo traçado da figura 19 A foi convertido em RMS.

No lado sadio, observa-se o traçado contendo a contração muscular (CM) do gastrocnêmio, esta caracteriza-se pelo espessamento do sinal padrão este denominado de interferencial (Figura 19 C), tal contração muscular atingiu o pico de aproximadamente 4 mV.

O traçado do lado experimental (Figura 19 C) convertido em RMS é mostrado na figura 19 D, observa-se o padrão de onda positiva denominado de senóide (S). A amplitude vista na RMS atinge em torno de 2,5 mV durante a contração muscular.

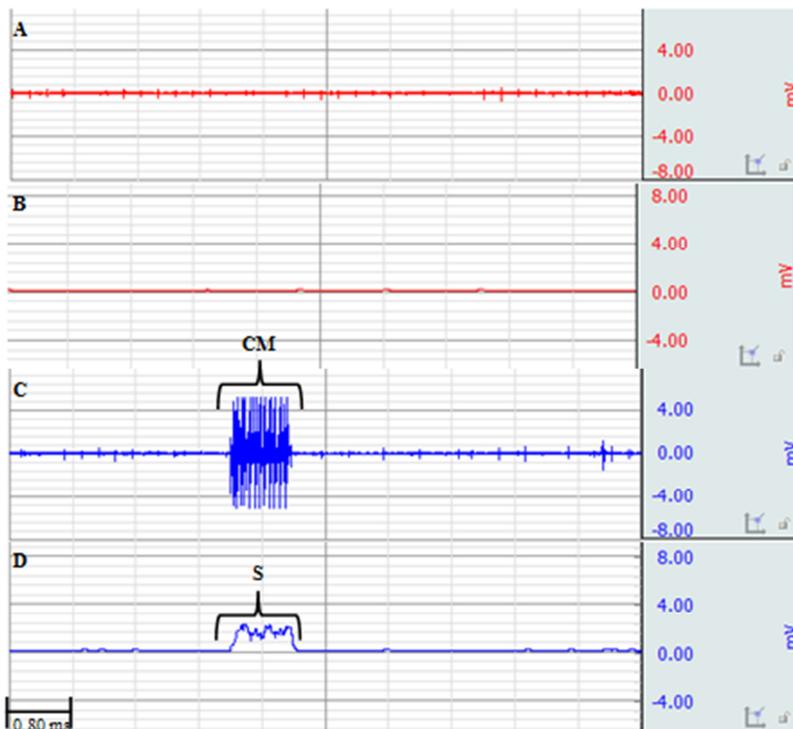


Figura – 19: Traçados eletromiográficos do rato representante do G1, no período de 24 horas após a lesão. A) trecho de 8 segundos do lado experimental. B) RMS do trecho A. C) Trecho de 8 segundos do lado sadio, notar período de contração muscular (CM). D) RMS do trecho C, notar a onda referente ao período de contração muscular, característica senóide (S). Barra horizontal, 0,80 milissegundos para todos os trechos.

Os traçados do G2 (exercitado 24 horas após a lesão durante 21 dias) referentes ao período de 24 horas após a lesão são mostrados na figura 20.

A figura 20 A mostra o traçado bruto da pata experimental durante um período de 8 segundos. Não é possível evidenciar nenhum tipo de atividade espontânea. O traçado bruto do lado experimental é convertido em RMS e mostrado na figura 20 B, nota-se a semelhança entre os traçados bruto e RMS por não haver nenhuma atividade.

Na figura 20 C é possível observar o traçado bruto do lado sadio, neste traçado evidenciamos uma contração muscular (CM) com uma amplitude atingindo em torno de 3 mV. Ainda neste traçado encontramos uma série de artefatos (setas da figura 20 C), no entanto, ainda em meio a tantos artefatos a contração muscular é bem delimitada.

Na figura 20 D é possível visualizar a RMS do traçado da figura 20 C (lado sadio), observa-se a contração muscular convertida em uma onda senóide (S), os artefatos também são mostrados na RMS (setas da figura 20 D).

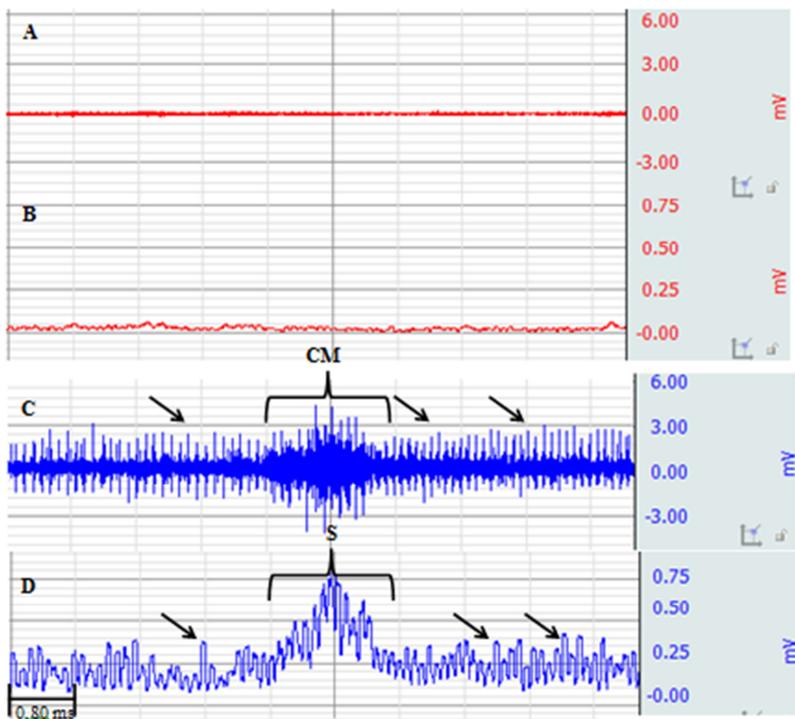


Figura – 20: Traçados eletromiográficos do animal representante do G2 período de 24 horas após a lesão. A) Período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental. B) RMS do traçado A. C) Traçado bruto do lado sadio, notar abaulamento no sinal causado pela contração muscular (CM), setas apontam artefatos no sinal. D) RMS do traçado D, contração muscular característica convertida em onda senóide (S), setas apontam exemplos de alguns artefatos.

O rato representante do G3 (exercitado durante 14 dias, iniciando sete dias após a lesão) têm seus traçados mostrados na figura 21.

A figura 21 A mostra um período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental, não é visto nenhum tipo de atividade espontânea. Na figura 21 B observamos o sinal bruto da figura 21 A convertido em RMS. O traçado referente ao lado sadio é mostrado na figura 21 C, é possível detectar a contração muscular ocorrendo (CM), tal contração atinge aproximadamente a amplitude de 2,0 mV no traçado bruto (período de 8 segundos).

A RMS do traçado referente ao lado sadio é vista na figura 21

D.

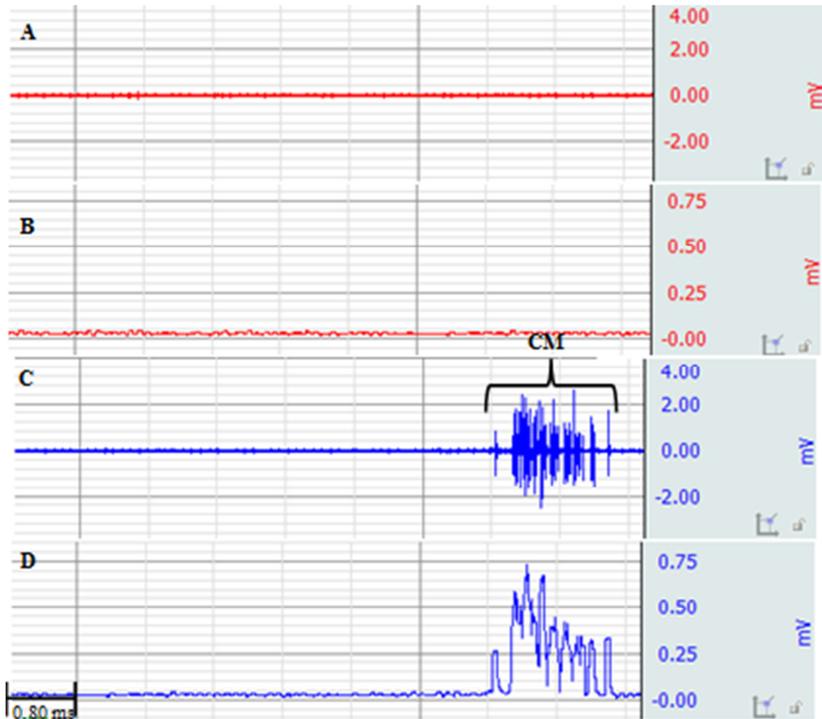


Figura – 21: Traçado eletromiográfico de animal do G3, período de 24 horas após a lesão. A) Período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental. B) RMS do traçado A. C) período de 8 segundos referente a pata sadia, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. barra horizontal 80 milissegundos.

Os traçados eletromiográficos do rato do G4 (Exercitados 24 horas após a lesão em dias alternados) são apresentados na figura 22.

Nota-se na figura 22 A um traçado bruto com período total de 8 segundos referente ao lado experimental, tal traçado foi convertido em RMS e é apresentado na figura 22B. Tanto no traçado bruto quanto no traçado convertido em RMS não foi possível detectar nenhum tipo de atividade espontânea ou outro fenômeno.

A figura 22 C apresenta o período de 8 segundos do traçado bruto referente ao lado sadio, observa-se a contração muscular (CM)

chegando a atingir em média a amplitude de 4,0 mV. Este traçado convertido em RMS é mostrado na figura 22 D, a amplitude em RMS chega a aproximadamente 1,0 mV.

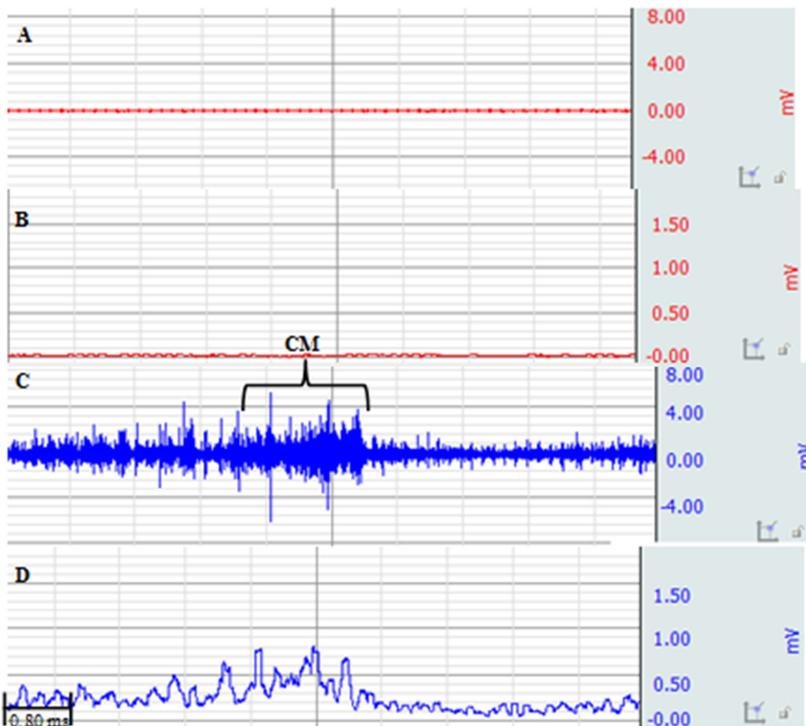


Figura 22: Traçado eletromiográfico do animal do G4. A) Sinal bruto proveniente do lado experimental, período de 8 segundos. B) RMS do traçado A. C) período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado sadio, notar período de contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. barra horizontal de 80 milissegundos.

Em resumo, ao se observar os traçados obtidos no registro de 24 horas após a lesão para os quatro grupos, é possível constatar que no lado experimental não houve nenhum tipo de atividade espontânea ou sinal de contração muscular que pudesse se correlacionar com o período de contração muscular observado no lado sadio. Isso mostra que a lesão nervosa foi feita com sucesso. De certa forma não podíamos esperar nenhuma grande diferença entre os grupos já que, ainda é muito precoce supormos que neste período fosse ocorrer algum tipo de efeito do

exercício sobre o processo de regeneração. Quanto ao lado sadio todas as contrações musculares pareceram típicas gerando um padrão interferencial no sinal (abaulamento), e uma onda em formato de senóide vista melhor através do sinal convertido em RMS.

5.2.2 Sete dias após a lesão

No sétimo dia após a lesão o traçado do lado experimental do G1 (controle) foi marcado por um grande número de potenciais espontâneos polifásicos, sinalizando potenciais do tipo fasciculação. Consideramos estes como potenciais espontâneos por aparecem em todo o período de registro, não somente durante a atividade do animal mas também no período de repouso.

A figura 23 A mostra o período de 8 segundos referente ao traçado bruto do animal advindo do G1, setas na figura apontam os potenciais espontâneos descritos anteriormente. Na figura 23 B é possível ver o mesmo trecho da figura 23 A convertido em RMS, observa-se os potenciais espontâneos também neste traçado.

Os traçados do lado sadio, bruto e RMS são mostrados nas figuras 23 C e D respectivamente, nota-se no traçado bruto o período de contração muscular (CM), tal contração atinge a amplitude aproximada de 3,0 mV, no traçado RMS a amplitude chega a valores levemente superiores a 1,0 mV.

Observa-se também que no traçado do lado sadio há um pequeno potencial antecedendo o período de contração muscular, possivelmente este potencial seja algum artefato do sinal (seta nas figuras 23 C e D).

Ao comparar os traçados de ambas as patas do animal não vemos nenhum sinal que se assemelha a contração muscular, ocorrendo no lado experimental, e que possa se correlacionar com o mesmo período de contração no lado sadio.

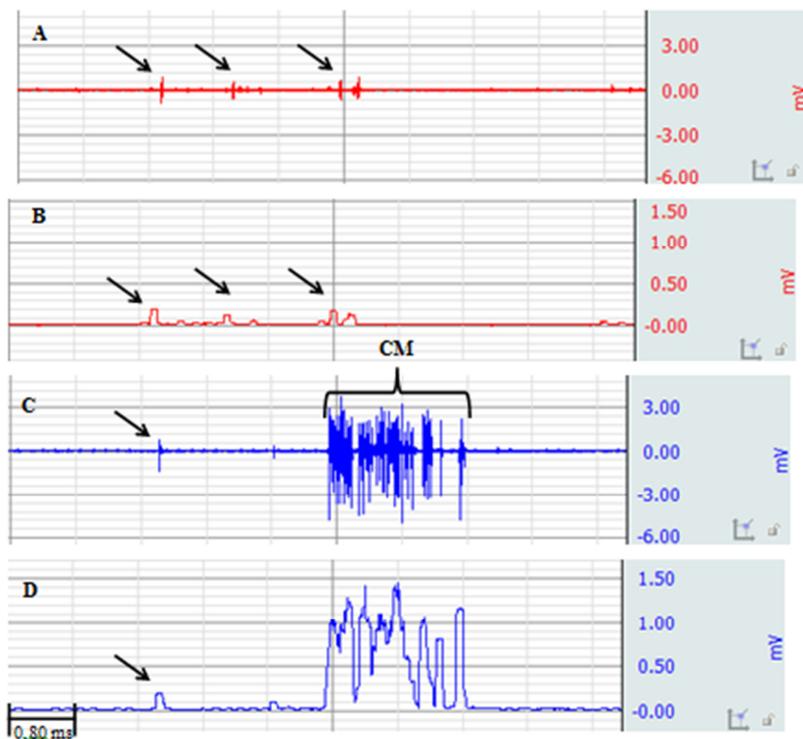


Figura – 23: Traçado eletromiográfico de animal do G1 período de sete dias após a lesão. A) período de 8 segundos de traçado bruto do lado experimental, setas na figura apontam potenciais de fasciculação. B) RMS do traçado A, notar potenciais espontâneos indicado pelas setas. C) Período de 8 segundos de traçado bruto do lado sadio, notar contração muscular (CM) evidente na parte média do sinal, seta indica possível artefato. D) RMS do traçado C, notar onda senóide causada pela contração muscular, seta indica possível artefato. Barra horizontal de 80 milissegundos.

Os registros do animal do G2 (exercitado 24 horas após a lesão durante 21 dias) no período de sete dias após a lesão nervosa são mostrados na figura 24.

Observa-se o traçado bruto proveniente do lado experimental (figura 24 A) um grande número de potenciais de fasciculação (setas na figura), nota-se também que não há nenhuma correspondência de contração muscular neste sinal para com o sinal do lado sadio (figura 24 C). A RMS do traçado experimental é observado na figura 24 B, as setas indicam os potenciais espontâneos.

A figura 24 C e D apresentam o traçado de 8 segundos do lado sadio, bruto e RMS respectivamente, observa-se a contração muscular (CM), chegando a valores levemente inferiores a 1,0 mV no traçado bruto, e 0,25 mV no RMS.

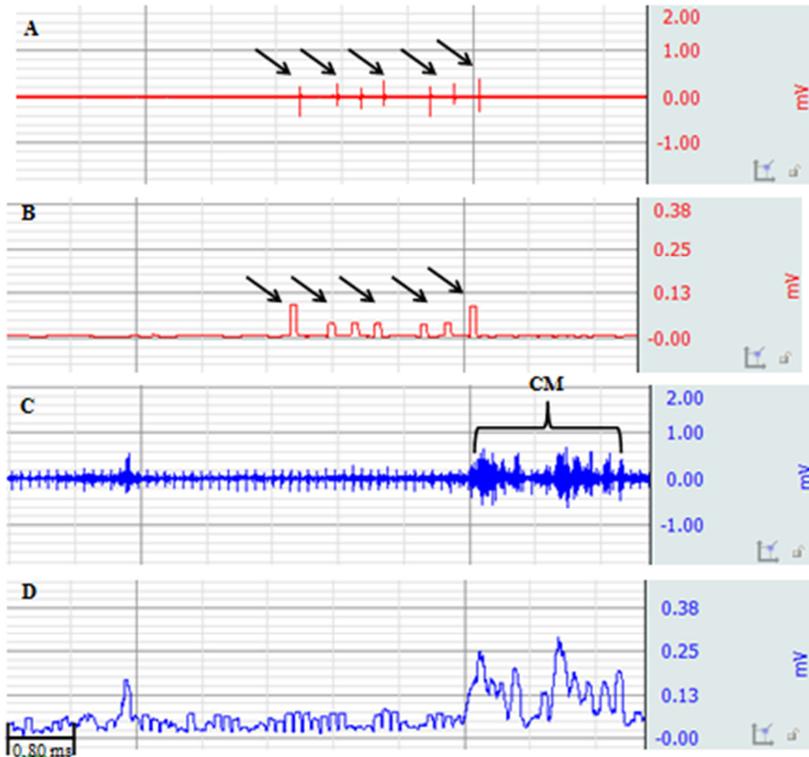


Figura – 24: Traçado eletromiográfico de rato do G2 período de sete dias após a lesão. A) Período de 8 segundos de traçado bruto do lado experimental, setas indicam potenciais espontâneos. B) RMS do traçado A, setas indicam potenciais espontâneos. C) período de 8 segundos de traçado bruto do lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 80 milissegundos

A figura 25 mostra o traçado eletromiográfico proveniente do G3 (exercitado durante 14 dias, iniciando sete dias após a lesão) no período de sete dias após a lesão.

Na figura 25 A é possível visualizar o período de 8 segundos de traçado bruto do lado experimental, nota-se um grande número de

potências espontâneos (setas na figura). Na figura 25 B os mesmos potenciais são vistos no traçado convertido em RMS.

A figura 25 C apresenta o registro do lado sadio, observa-se a contração muscular (CM) atingindo em torno de 5 mV no traçado bruto e aproximadamente 3 mV no traçado convertido em RMS (figura 25 D).

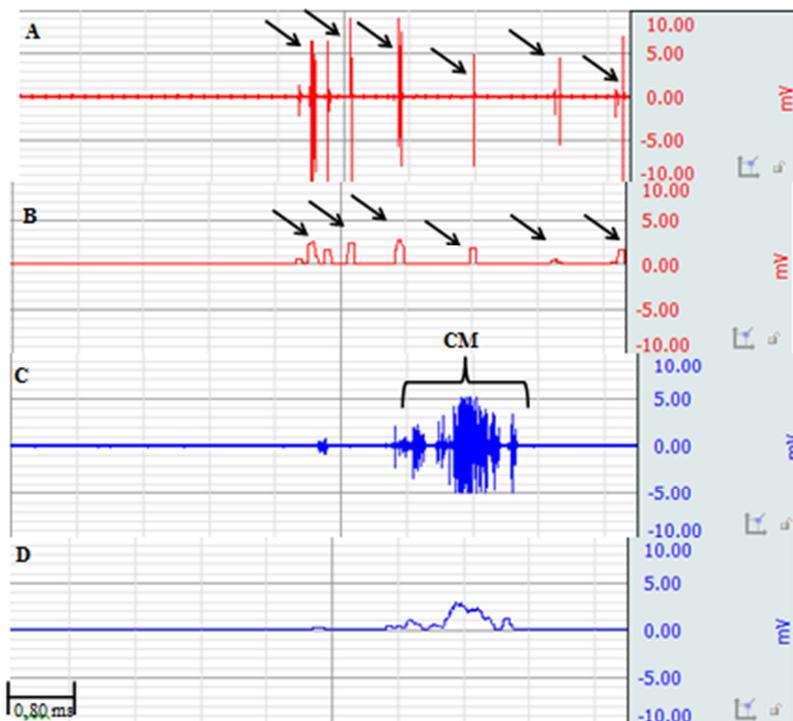


Figura – 25: Traçado eletromiográfico de rato do G3 período de sete dias após a lesão nervosa. A) Período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental, notar potências espontâneos mostrado pelas setas. B) RMS do traçado A. C) período de 8 segundos referente ao registro do lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 80 milissegundos

Os traçados do G4 (Exercitados 24 horas após a lesão em dias alternados) no período de sete dias após a lesão são mostrados na figura 26.

Na figura 26 A é possível visualizar o período de 8 segundos do traçado bruto do lado experimental, nota-se potências de fasciculação

(setas), tais potências também aparecem no traçado quando convertido em RMS, (figura 26B).

Na figura 26 C, observa-se o traçado bruto no lado sadio, o período de contração muscular (CM) atinge no traçado bruto em torno de 6,0 mV em quanto que no traçado convertido em RMS chega a 2,0 mV.

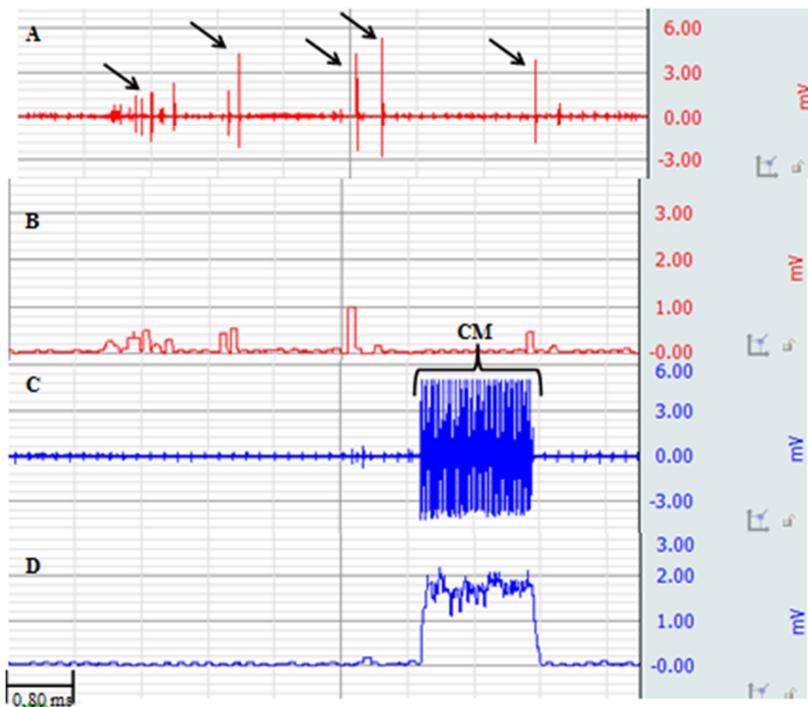


Figura – 26: Traçado eletromiográfico de rato do G4 período de sete dias após a lesão nervosa. A) período de 8 segundos de traçado bruto do membro experimental, notar potenciais espontâneos apontados pelas setas. B) RMS do traçado A, potenciais espontâneos também presentes (setas). C) período de 8 segundos referente ao membro sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 80 milissegundos.

Em suma, no período de sete dias após a lesão nervosa, ao examinarmos os traçados do lado experimental não constatamos nenhum tipo de contração muscular, no entanto, o sinal é marcado por potenciais espontâneos, sobretudo potenciais de fasciculação, diferentemente dos

traçados observados 24 horas após a lesão que não apresentavam fenômeno algum.

Os sinais provenientes do lado sadio continuam apresentando o período de contração muscular característico.

5.2.3 Quatorze dias pós – lesão

O registro eletromiográfico do animal referente ao G1 (controle) no período de quatorze dias após a lesão é mostrado na figura 27.

A figura 27 A mostra o registro bruto do lado experimental, período de 8 segundos. É possível constatar um período de contração muscular (CM) que coincide com a contração muscular vista no lado sadio (figura 27 C). Ainda que esta contração não apareça bem delimitada, chega a amplitude aproximada de 3,0 mV, antecedendo esta contração muscular no mesmo traçado, observa-se uma série de potenciais espontâneos (setas na figura 27 A). A figura 27 B é a RMS do traçado descrito anteriormente, nota-se também a contração muscular agora atingindo aproximadamente 1,0 mV.

Os traçados bruto e RMS do lado sadio são mostrados nas figuras 27 C e D respectivamente. No lado sadio ao observar o traçado bruto vemos a contração muscular atingindo uma amplitude de aproximadamente 4,0 mV. No traçado convertido em RMS a amplitude da contração muscular atinge cerca de 2,0 mV.

Ainda no sinal do lado sadio observa-se pequenos sinais logo após a contração muscular (setas na figura 27 C), possivelmente tratam-se de artefatos.

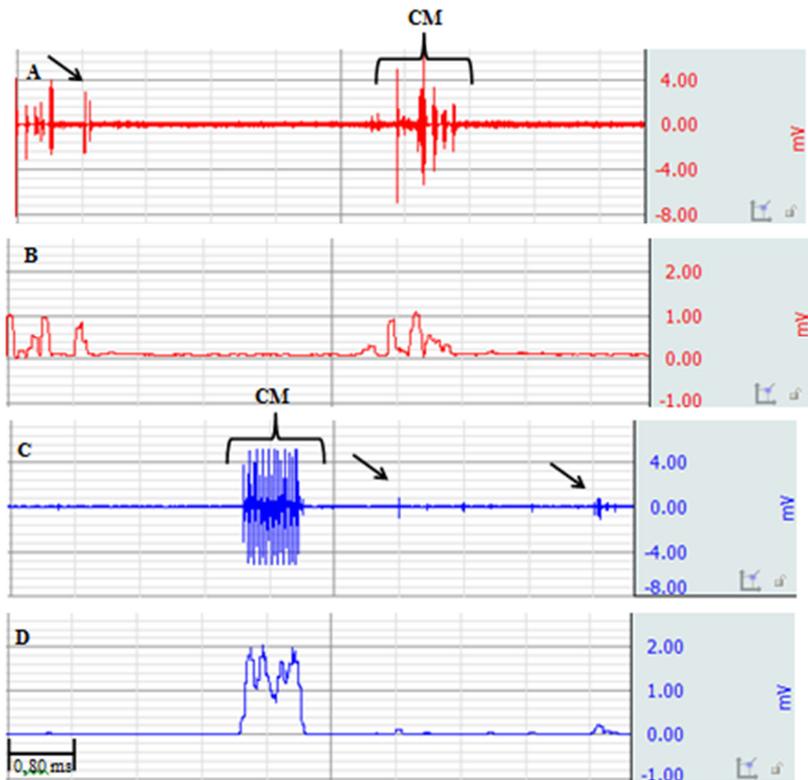


Figura – 27: Traçado eletromiográfico de animal do G1 período de quatorze dias após a lesão. A) Período total de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental, notar contração muscular aparecendo (CM), notar também potenciais espontâneos (setas). B) RMS do traçado A. C) Período de 8 segundos de traçado bruto proveniente do lado sadio, notar contração muscular (CM) e alguns artefatos no sinal (setas). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 80 milissegundos.

Os traçados do G2 (exercitado 24 horas após a lesão durante 21 dias) no período de quatorze dias após a lesão são apresentados na figura 28.

O traçado bruto do lado experimental é apresentado na figura 28 A, nota-se que o traçado possui uma série de potenciais espontâneos (setas), o período de contração muscular (CM) é mais robusto, e facilmente diferenciável dos potenciais espontâneos, tal período atinge a amplitude aproximada de 5,0 mV no traçado bruto e 2,0 mV no traçado convertido em RMS (figura 28 B).

No lado sadio a contração muscular chega a 6,0 mV ao se observar o traçado bruto, na RMS atinge aproximadamente 2,5 mV, como visto na figura 28 C e D respectivamente.

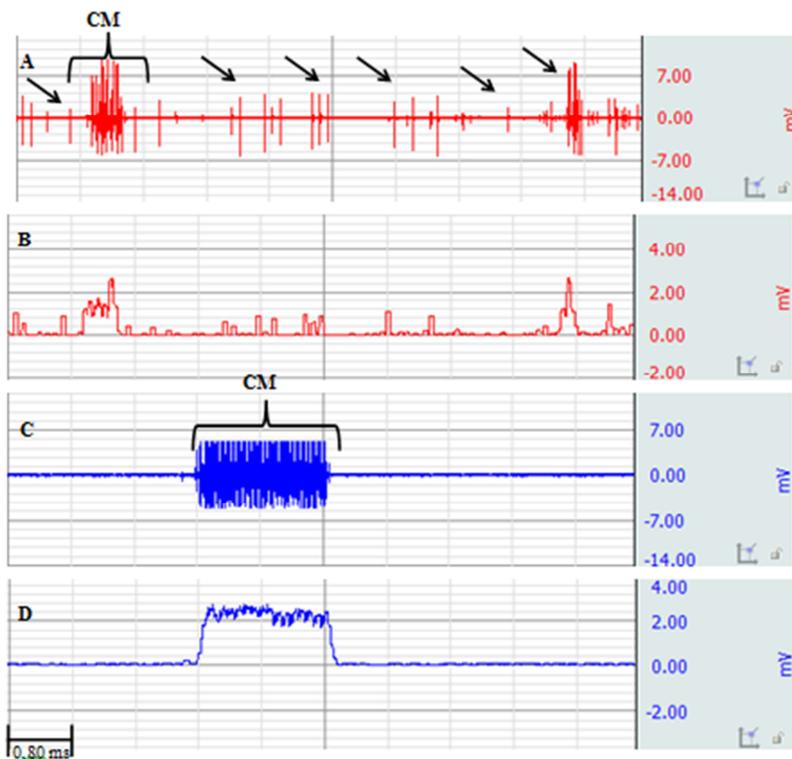


Figura – 28: Traçado eletromiográfico de animal do G2, período de quatorze dias após a lesão. A) Período de 8 segundos de traçado bruto do lado experimental, notar contração muscular (CM), e potenciais espontâneos (setas). B) RMS do traçado A. C) Traçado de 8 segundos referente ao lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 80 milissegundos.

Os traçados do G3 (exercitado durante 14 dias, iniciando sete dias após a lesão) para o período de quatorze dias após a lesão são mostrados na figura 29.

A figura 29 A mostra o traçado bruto do lado experimental, nota-se um período de contração muscular altamente irregular (CM), acompanhado de um grande número de atividade espontânea (setas na figura). Tal contração atinge aproximadamente 5,0 mV. Na figura 29 B nota-se a RMS do traçado bruto do lado experimental aonde a amplitude da contração muscular chega a 2,0 mV.

Nas figuras 29 C e D são mostrados os traçados bruto e RMS do lado sadio respectivamente. No Traçado bruto o período de contração muscular (CM) atinge valores de amplitude em torno de 3,5 mV e 1,75 mV no RMS.

A exemplo do rato do G1 para o mesmo período, no lado sadio o traçado também apresenta alguns artefatos (setas da figura 29 C).

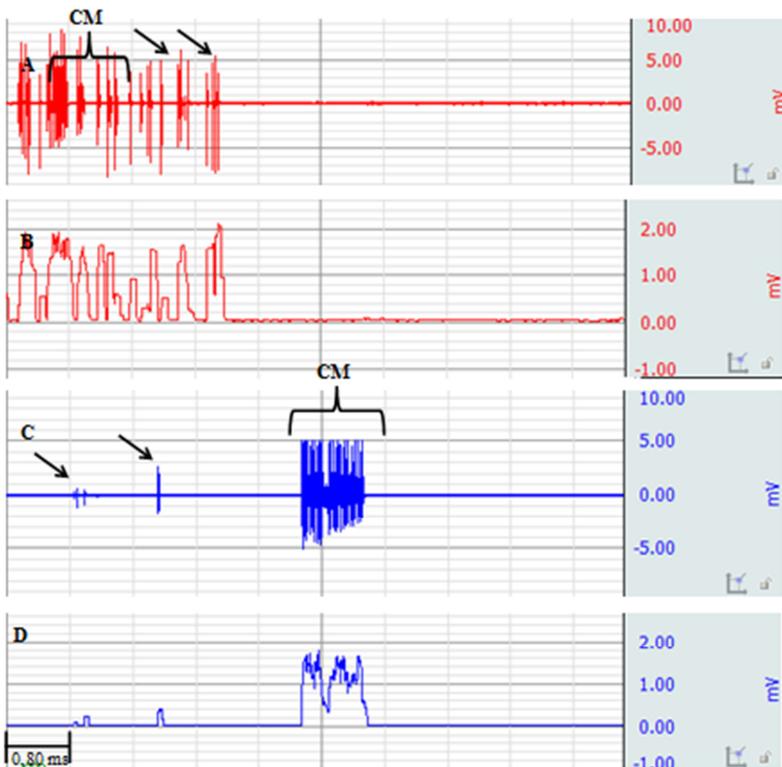


Figura – 29: Traçado eletromiográfico de rato do G3, período de quatorze dias após a lesão. A) período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental, notar contração muscular (CM) acompanhado de potenciais espontâneos (setas). B) RMS da figura A. C) Traçado bruto do lado sadio, notar contração muscular (CM), setas indicam possíveis artefatos. Barra horizontal de 80 milissegundos

O animal do G4 (Exercitados 24 horas após a lesão em dias alternados) é mostrado na figura 30.

Pode-se observar na figura 30 A onde traçado bruto do lado experimental é mostrado, que um período de contração muscular acontece chegando a amplitude aproximada de 2,0 mV. Apesar de não estarem presentes neste trecho da figura, potenciais espontâneos também foram encontrados neste sinal. Na figura 30 B é possível visualizar a RMS do traçado bruto com a contração muscular chegando em torno de 1,75 mV.

No lado sadio a contração muscular atinge cerca de 3,5 mV no traçado bruto (figura 30 C) e 2 mV no traçado bruto convertido em RMS. (figura 30 C e D respectivamente).

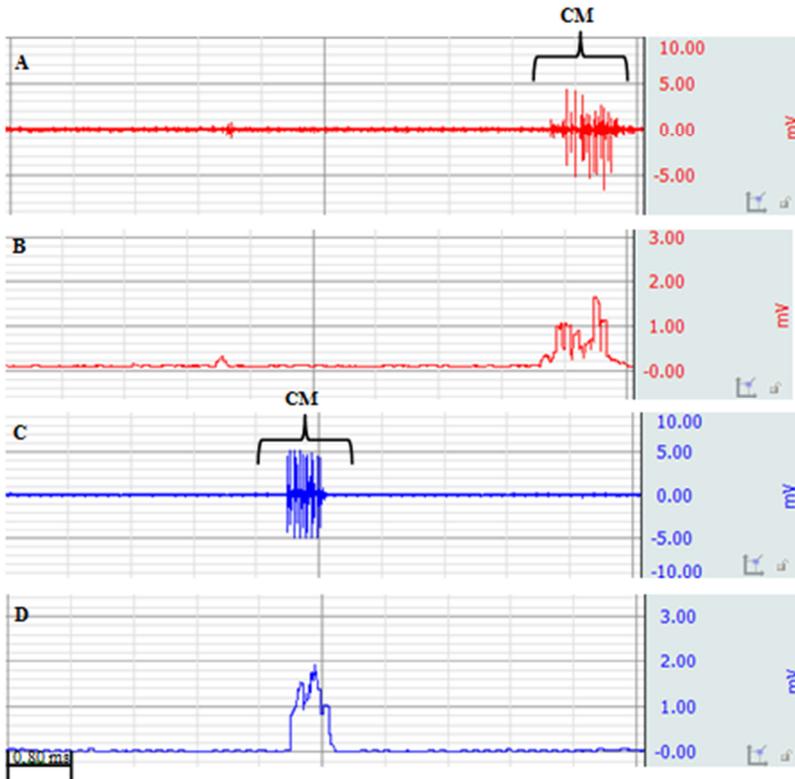


Figura – 30: Traçados eletromiográficos de rato do G4, período de quatorze dias após a lesão. A) período total de 8 segundos do lado experimental, notar período de contração muscular (CM). B) RMS do traçado A. C) Período de 8 segundos referente ao lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. barra horizontal de 80 milissegundos.

Em resumo, a observação dos traçados no período de quatorze dias após a lesão mostram uma evolução interessante comparado aos demais períodos, agora em todos os traçados provenientes do lado experimental, pudemos constatar um sinal mais semelhante a contração muscular. Tal sinal de contração muscular vem intercalado com o período de contração muscular observado no lado sadio, ainda que este sinal observado no lado experimental seja mais tênue e por vezes de formato não típico quando comparado ao lado sadio.

Em todos os sinais no lado experimental constatamos potenciais espontâneos no período em que o animal encontra-se em repouso.

As contrações musculares no lados sadio continuam seguindo o padrão dentro da normalidade.

5.2.4 Vinte e um dias pós – lesão

As características do sinal eletromiográfico proveniente do rato do G1 (controle, sedentário) no período de 21 dias após a lesão são mostrada na figura 31.

A figura 31 A mostra um trecho de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental, é possível visualizar a contração muscular (CM) atingindo em torno de 0,75 mV. No traçado convertido em RMS (figura 31 B), a contração muscular atinge em torno de 0,50 mV. Potenciais espontâneos foram encontrados no decorrer deste traçado.

A figura 31 C mostra o período de 8 segundos referente ao lado sadio, nota-se a contração muscular (CM) chegando a aproximadamente 0,80 mV no traçado bruto. Na figura 31 D o traçado da figura 30 C é convertido em RMS, a contração muscular chega a casa dos 0,40 mV.

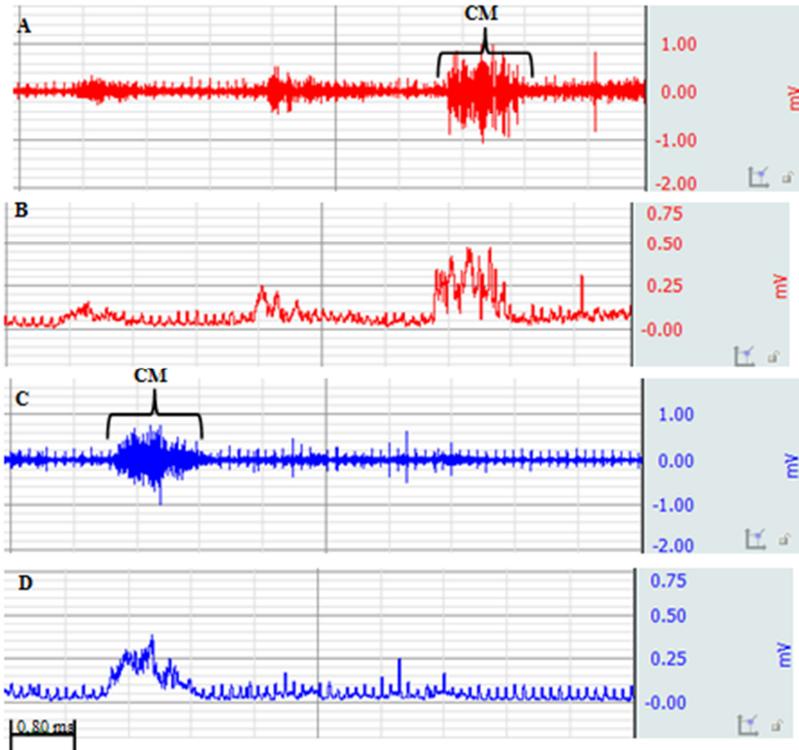


Figura – 31: Traçado eletromiográfico de rato do G1, período de 21 dias após a lesão. A) Período de 8 segundos referente ao traçado bruto do lado experimental, notar contração muscular (CM). B) RMS do traçado A. C) Trecho de 8 segundos referente ao lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 0,80 milissegundos.

A figura 32 mostra o rato do G2 (exercitado 24 horas após a lesão durante 21 dias) no período de 21 dias após a lesão.

O traçado bruto e RMS do lado experimental são apresentados na figura 32 A e B respectivamente.

No traçado bruto referente ao lado experimental a contração muscular (CM) chega a casa dos 5,0 mV, já no traçado convertido em RMS este atinge em torno de 2,0 mV.

No lado sadio o traçado bruto mostra a contração muscular (CM) chegando a 7,0 mV, a RMS mostra uma amplitude de 4,0 mV (figura 32 C e D respectivamente).

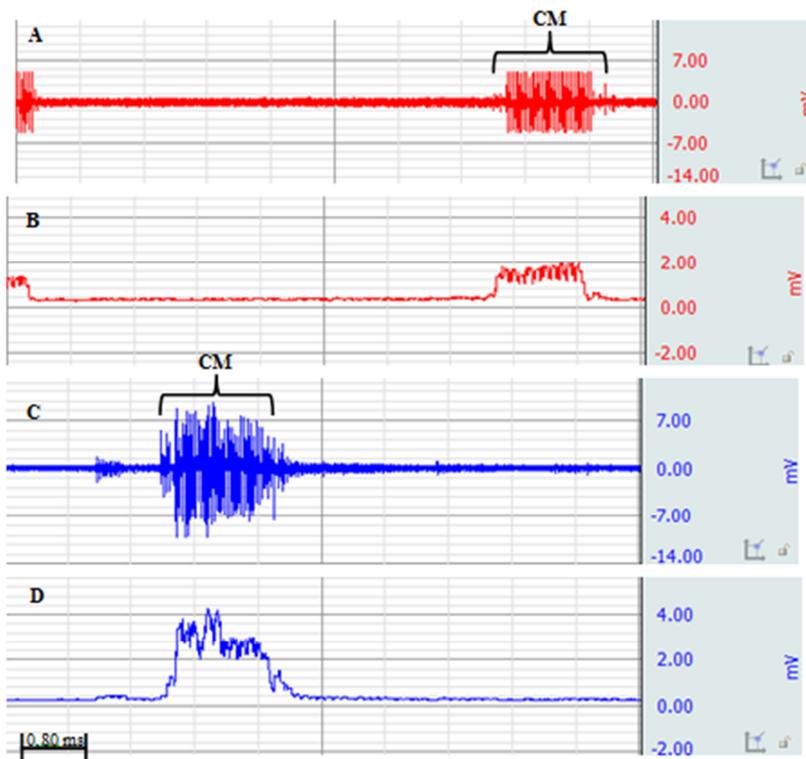


Figura – 32: Traçado eletromiográfico de rato do G2, período de 21 dias após a lesão. A) Traçado de 8 segundos referente ao lado experimental, notar contração muscular (CM). B) RMS do traçado A. C) Período de 8 segundos de traçado do lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 0,80 milissegundos.

O rato do G3 (exercitado durante 14 dias, iniciando sete dias após a lesão) têm seus traçados mostrados na figura 33, para o período de 21 dias após a lesão.

Na figura 33 A observa-se o traçado bruto proveniente do lado experimental (período total de 8 segundos), nota-se a contração muscular atingindo um amplitude em torno de 1,75 mV. No traçado convertido em RMS mostrado na figura 33 B a amplitude da contração muscular ultrapassa 1,0 mV chegando a 1,50 mV.

Na figura 33 C e D observa-se respectivamente os traçados bruto e RMS referentes ao lado sadio. Nota-se no traçado bruto do lado sadio a contração muscular atingindo em torno de 2,0 mV, em quanto no

traçado via RMS tal contração chega a valores levemente inferiores a 1,0 mV.

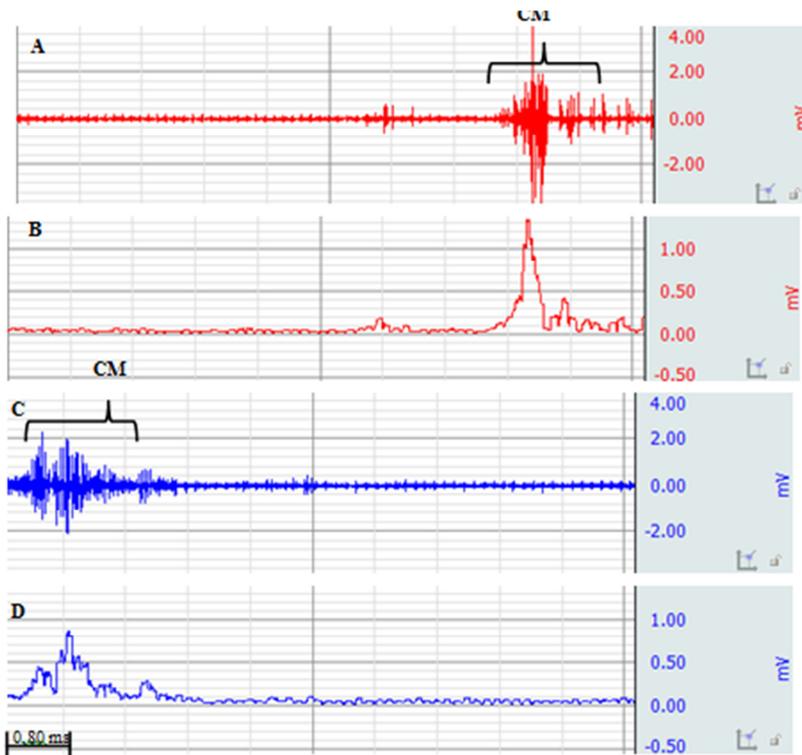


Figura – 33: Traçado eletromiográfico de rato do G3, período de 21 dias após a lesão. A) Traçado bruto do lado experimental (período de 8 segundos) notar contração muscular (CM). B) RMS do traçado A. C) Traçado bruto referente a lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 0,80 milissegundos.

Por último, os traçados do G4 (Exercitados 24 horas após a lesão em dias alternados) são mostrados na figura 34. Na figura 34 A o traçado bruto do lado experimental é mostrado (período total de 8 segundos) nota-se o período de contração muscular (CM) chegando a 4,0 mV. No traçado convertido em RMS, a contração muscular do lado experimental atinge em torno de 3,5 mV.

A figura 34 C mostra o traçado bruto referente ao lado sadio, neste traçado a contração muscular (CM) atinge a amplitude de 7,0 mV.

No traçado via RMS (figura 34 D) a amplitude da contração muscular do lado sadio chega a valores um pouco inferiores a 4,0 mV.

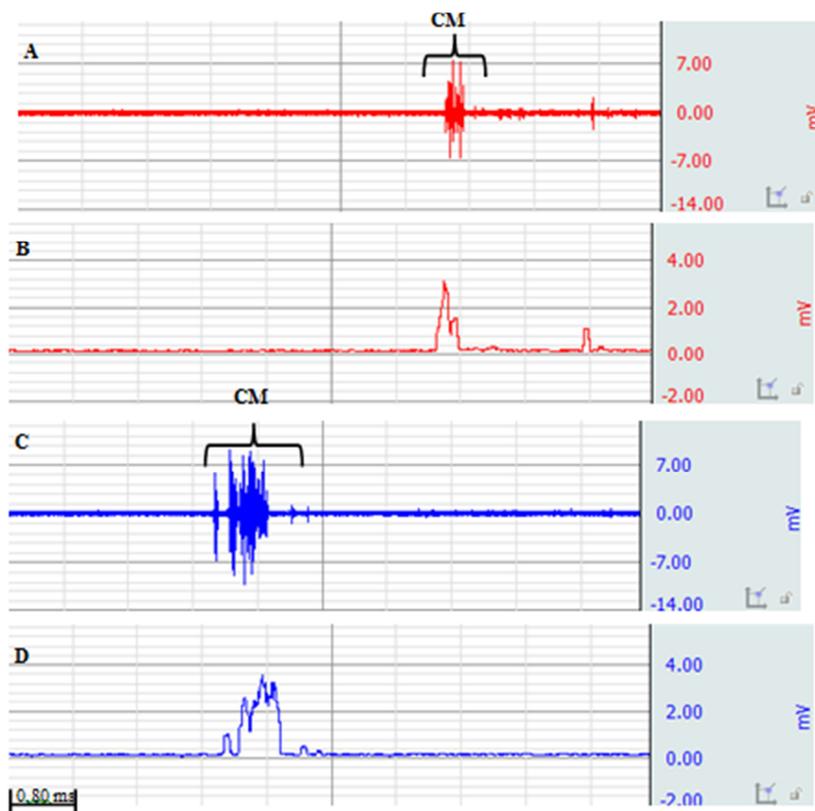


Figura – 34: Traçado eletromiográfico de rato do G4, período de 21 dias após a lesão. A) Traçado bruto proveniente do lado experimental, período de 8 segundos, notar contração muscular (CM). B) RMS do traçado A. C) Traçado bruto proveniente do lado sadio, notar contração muscular (CM). D) RMS do traçado C. Barra horizontal de 0,80 milissegundos.

Em resumo, ao observar os traçados provenientes do último dia de registro (21 dias após a lesão) dos grupos 1 ao 4, nota-se que a contração muscular no lado experimental persiste. Potências espontâneos ainda estavam presentes, porém aparecerem com menor frequência neste período em comparação a semana anterior.

Além disso fazendo um comparativo dos traçados de cada grupo nota-se que a evolução se deu de forma homogênea.

Em todos os grupos, no período de 24 horas após a lesão, não foi observado nenhum tipo de atividade no lado experimental.

Com sete dias após a lesão os potenciais espontâneos já estavam presentes.

Após quatorze dias de lesão, no lado experimental começou-se a se registrar potenciais mais amplos e robustos referentes a contração muscular.

Após vinte e um dias de lesão, os potenciais de contração muscular no lado experimental continuaram aparecendo.

Quanto ao lado sadio em todos os grupos notou-se a contração muscular ocorrendo desde o primeiro registro, nenhum tipo de alteração neste sinal foi constatada a exemplo dos fenômenos encontrados no lado que recebeu a lesão.

5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Vinte e um dias após a lesão nervosa os animais foram sacrificados e realizou-se a retirada dos tecidos para a análise. Os músculos gastrocnêmios direitos (lado experimental) e os cotos proximais e distais dos nervos isquiáticos direitos foram destinados ao processamento histológico.

Os músculos foram corados com Hematoxilina – eosina e os nervos com Giemsa.

5.3.1 Músculo gastrocnêmio

Para os músculos realizou-se a análise apenas visual a fim de se detectar possíveis alterações morfológicas. Utilizou-se o aumento de 200X para a inspeção visual das imagens.

A figura 35 A,B,C e D mostra quatro fotomicrografias de animais dos grupos G1 ao G4 respectivamente.

A inspeção visual para os quatro grupos mostra características semelhantes com sinais claros de atrofia muscular mesmo para os grupos 1,2 e 3 que foram exercitados.

É possível constatar áreas com fibras de tamanho irregular com perda total da morfologia poligonal esperada, atingindo diâmetros extremamente pequenos como pode ser visto nas figura 35 A e C (*). Além disso, nota-se aproximação dos núcleos (setas finas na figura 34 A,B,C e D), e também pontos com larga proliferação de tecido conjuntivo (setas espessas na figura 35 A,B,C e D).

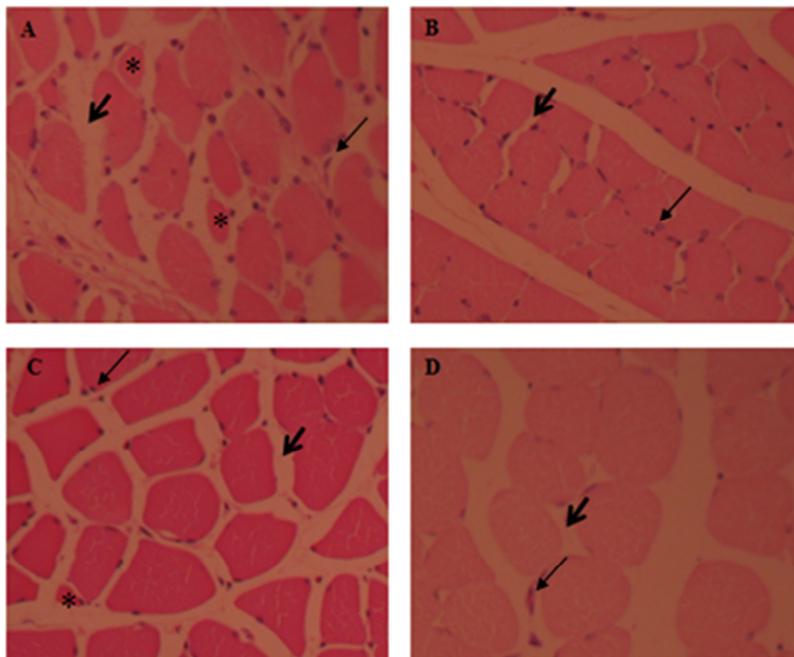


Figura – 35: Fotomicrografia dos músculos gastrocnêmios direitos dos grupos G1 ao G4, A,B,C e D respectivamente. Notar fibras com a perda da morfologia poligonal típica (*), aproximação dos núcleos (setas finas), e aumento na proliferação do tecido conjuntivo (setas espessas), Magnificação de 200X, coloração Hematoxilina – eosina.

5.3.2 Nervo isquiático

Para a inspeção visual dos nervos utilizou-se aumento de 400X tanto no coto proximal quanto distal.

A figura 36 A, B, C e D, mostra os cotos proximais para os grupos G1 ao G4 respectivamente.

A figura 37 A, B, C e D, mostra os cotos distais para os grupos G1 ao G4 respectivamente.

Em todos os grupos não foi possível distinguir entre porções mais ou menos mielinizadas.

Observa-se áreas com uma grande quantidade de fibras nervosas degeneradas (setas finas nas figuras 36 e 37) eventualmente, alguns axônios com sua bainha de mielina mantiveram-se preservados (setas espessas nas figuras 36 e 37). O distanciamento presente entre as fibras dá ao tecido a característica de degeneração.

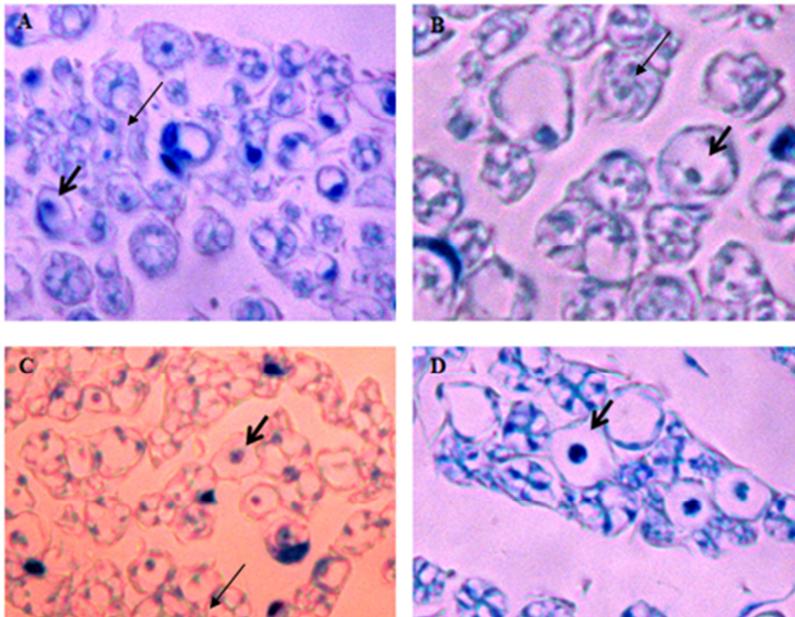


Figura – 36: Fotomicrografias das porções proximais dos nervos isquiáticos direitos dos grupos G1 ao G4, A,B,C e D respectivamente. Notar degeneração do tecido (setas finas), e fibras mielinizadas preservadas (setas espessas). Magnificação de 400X, coloração de Giemsa.

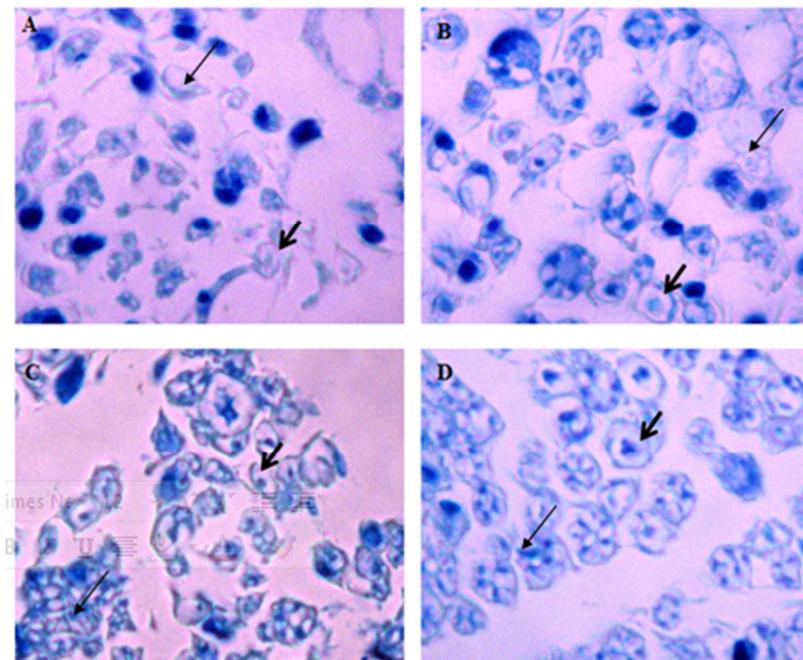


Figura – 37: Fotomicrografias das porções distais dos nervos isquiáticos direitos dos grupos G1 ao G4, A,B,C e D respectivamente. Notar degeneração do tecido (setas finas), e fibras mielinizadas preservadas (setas espessas). Magnificação de 400X, coloração de Giemsa.

5.4 ANÁLISE BIOMOLECULAR, RT-PCR

Os resultados da análise biomolecular realizada através da RT – PCR foram separados em quatro gráficos de barras, um para cada gene em questão. Nos gráficos, a comparação dos grupos 2,3 e 4 é feita sempre contra o G1 tido como nosso grupo de referência, mas, as diferenças existentes entre os grupos exercitados serão descritas no texto.

A figura 38 A mostra o gráfico com a expressão do BDNF nos quatro grupos, a linha horizontal sobre G1 (presente também nos demais gráficos) refere-se aos valores de referência do grupo controle.

Observa-se diferença estatística significativa de todos os grupos exercitados contra o grupo 1. Os valores médios da expressão e desvio

padrão foram: G1 ($0,94 \pm 0,19$), G2 ($7,32 \pm 1,32$), G3 ($2,62 \pm 0,94$) e G4 ($4,72 \pm 0,94$).

O maior pico de expressão se deu no G2 (exercitado diariamente), além disso este apresentou diferença significativa contra os grupo 3 e 4 com valor de $p < 0,001$.

A expressão mais baixa foi constatada no grupo 3 com valor de $p < 0,05$. Quando comparado ao grupo 4 mostrou valor também significativo ($p < 0,01$).

Quando observa-se o G4 é possível visualizar valores inferiores ao grupo 2 e um pouco superiores ao grupo 3.

A figura 38 B refere-se ao segundo fator neurotrófico quantificado o NGF.

Os valores das médias e desvio padrão da expressão do NGF apresentada pelos grupos foram: G1 ($1,04 \pm 0,16$), G2 ($10,86 \pm 1,80$), G3 ($4,96 \pm 0,83$) e G4 ($7,60 \pm 1,14$).

A exemplo do BDNF houve também uma maior expressão do NGF no G2 (exercitado diariamente) com valores muito superiores ao G1 ($p < 0,001$), além disso quando comparado aos grupos 3 e 4 mostrou também uma diferença significativa ($p < 0,001$).

A menor expressão de NGF foi observada no G3 (padrão semelhante do mesmo grupo foi observado para o BDNF) com valor de $p < 0,001$. Quando comparado ao G4 mostrou diferença de $p < 0,01$.

No G4 nota-se valores inferiores ao G2 e um pouco superiores ao G3.

Para a enzima iNOS os valores do G2 foram os mais inferiores com valor de $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. Quando comparado aos demais grupos observou-se diferença de $p < 0,001$.

O grupo onde encontrou-se a mais alta expressão da iNOS foi o G3 com diferença de $p < 0,01$ contra o grupo controle. Não houve diferença significativa do G3 para o G4.

A respeito do G4 neste observa-se valores superiores ao G2 e um pouco inferiores ao G3.

Os valores da média e desvio padrão foram: G1 ($1,00 \pm 0,07$), G2 ($0,14 \pm 0,07$), G3 ($0,12 \pm 0,05$) e G4 ($0,52 \pm 0,19$).

A figura 38 C mostra a expressão da iNOS nos diferentes grupos.

Em relação a quantificação da expressão da citocina TNF – α , nota-se que o G2 foi o que menos expressou tal citocina, $p < 0,001$ contra o grupo controle.

Em comparação aos grupos 3 e 4, o G2 obteve um valor de significância de $p < 0,001$.

O G3 apresentou a maior expressão da citocina com valor de $p < 0,01$. Não houve diferença significativa do G3 para o G4, mesmo padrão observado na expressão da iNOS.

O G4 mostrou uma expressão superior ao G2 e levemente inferior ao G3.

Os valores de média e desvio padrão dos grupos referente a expressão de TNF - α são os seguintes: G1 ($1,00 \pm 0,07$), G2 ($0,22 \pm 0,11$), G3 ($0,80 \pm 0,11$) e G4 ($0,66 \pm 0,09$).

A figura 38 D mostra a expressão do TNF - α em todos os grupos.

Em resumo o padrão dos gráficos foi semelhante, mostrando uma maior expressão dos fatores neurotróficos BDNF e NGF no G2, em contraste com uma baixa expressão de iNOS e TNF - α .

Em segundo lugar o grupo que apresentou uma expressão de BDNF e NGF mais acentuada foi o G4, contrastando também com a segunda menor expressão de iNOS e TNF - α .

Por último o G3 mostrou os menores níveis de BDNF e NGF apresentado a maior expressão da iNOS e de TNF - α .

Parece que o exercício físico independentemente da frequência em que foi executado, mostrou promover o aumento na expressão dos fatores neurotróficos BDNF e NGF e diminuição da enzima iNOS e da citocina TNF - α , quando comparado ao grupo controle.

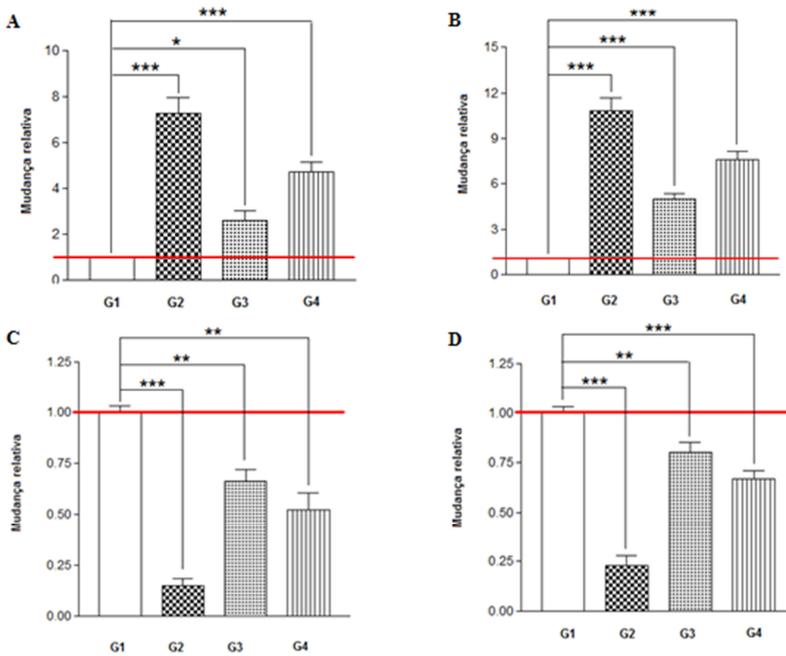


Figura – 38: Quantificação dos fatores neurotróficos BDNF, NGF, enzima iNOS e da citocina TNF – α , G1= grupo1, G2= grupo 2, G3= grupo3, G4= grupo 4. A) Quantificação da expressão de BDNF. B) Quantificação da expressão de NGF. C) Quantificação da expressão de iNOS. D) Quantificação da expressão de TNF – α .

6 DISCUSSÃO

Como meio de treinamento físico o nado é eficaz pois tanto na fase aguda quanto crônica tem se mostrado capaz de acelerar o processo de regeneração, embora ainda não haja consenso sobre a melhor hora de se iniciar o exercício e o período adequado de treinamento (TEODORI *et.al.*, 2011; UDINA *et.al.*, 2011). Considerando o contexto do exercício é possível especular que os estímulos táteis, térmicos e proprioceptivos da natação favoreçam o processo de regeneração através da ativação cruzada (MUNN, *et.al.*, 2005), visto que, durante o processo exige-se a ativação muscular dos membros bilateralmente (TEODORI *et.al.*, 2011).

No entanto, Herbison e colaboradores afirmam que o exercício em especial o nado inibe o processo de reinervação muscular (HERBISON, *et.al.*, 1974), isso nos leva a especular sobre até que ponto o exercício em especial o nado é benéfico ou maléfico para o processo regenerativo.

Optamos por utilizar a água como meio de exercício que proporcionasse estímulo aos animais, além do nado ser uma qualidade inata dos ratos é bem descrito que a água aquecida é capaz de propiciar aumento do fluxo sanguíneo local pela dilatação vascular, e também gerar analgesia devido a sua característica térmica. Porém, não somente os aspectos positivos do meio líquido devem ser levados em conta, existe o estresse causado pelo natação que a longo prazo pode se tornar deletério (ARAÚJO; 2008).

Ao se estudar o processo de regeneração nervosa periférica através de vários meios de análise, tem-se como vantagem a possibilidade de avaliar o problema sob diversas óticas. No entanto, nem sempre é possível estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos através destas análises (MONTE-RASO; 2006). Em estudos experimentais, não há medida perfeita para estimar a regeneração nervosa (KANAYA *et.al.*, 1996).

Neste estudo utilizaram-se métodos de análise que pudessem proporcionar dados funcionais, eletrofisiológicos, morfológicos e biomoleculares.

Os resultados foram apresentados separadamente nas páginas anteriores, a discussão se concentra agora em comparar os resultados com os dados encontrados na literatura e correlacioná-los quando possível.

Na análise individual do desempenho dos animais por grupo foi possível notar que independentemente do grupo constatou-se que a recuperação funcional chega para todos por volta do 21º dia após a lesão

(Figura 16), a excessão foi o grupo 2 que não mostrou diferença do 21° para o 14° dia após a lesão.

Em relação aos grupos exercitados foi possível observar uma real diferença, sobretudo no 14° dia após a lesão onde tais grupos mostraram diferença contra o primeiro dia após a lesão. Além disso os grupos 2 e 3 no 14° dia apresentaram diferença contra o 7° dia.

Os dados apontam para uma melhora mais rápida dos grupos exercitados em relação ao controle, começando por volta do 14° dia (excessão do grupo 4 que mostrou diferença do 7° para o 1° dia após a lesão), já que, ao observar o gráfico de IFC do grupo controle não observa-se diferença entre os períodos 1°, 7° e 14° dia após a lesão.

Quanto a comparação entre os grupos exercitados contra o controle, observa-se que a diferença ocorre no período de 14 dias após a lesão nervosa nos grupos 2 e 3, e no período de 21 dias após a lesão no grupo 3. O grupo 4 não apresentou diferença do controle em nenhum dos períodos de registro do IFC.

Pesquisas anteriores de nosso laboratório realizadas por Possamai e colaboradores (2010), utilizando roda motorizada para promover o exercício em ratos durante os períodos de 7, 14 e 21 dias, após axonotmese, geraram resultados de IFC divergentes dos nossos. Neste experimento, a respeito da melhora funcional os pesquisadores não encontraram diferença estatisticamente significativa do grupo controle para os grupos exercitados, mostrando um padrão semelhante de evolução em todas as curvas do gráfico. Como visto, em nossos experimentos o G2 (exercitado diariamente) e o G3 (exercitado sete dias após a lesão) mostraram diferença do grupo controle (14 dias após a lesão G2 e G3 e 21 dias após a lesão G3).

Entretanto os autores sugerem uma aparente vantagem para os grupos exercitados contra o controle, fato este também observado em nosso trabalho (POSSAMAI *et.al.*, 2010).

Independentemente do grupo estudado, com 21 dias pós – lesão é possível constatar que já ocorre uma recuperação da função motora de forma homogênea, contudo, de acordo com Van Meeteren e colaboradores (1997) é de se esperar com 21 dias uma recuperação funcional de forma espontânea. Tal recuperação é constatada quando se observa que todos os grupos atingem valores de IFC próximos de zero.

De acordo com Gorio e colaboradores (1983), o período que compreende do 21° ao 28° dia é crucial para o pico de reinervação, o que da base para a melhora funcional observada nos valores do IFC de nosso estudo.

Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos tais como o estudo de Teodori e colaboradores (2011), que utilizaram o IFC para avaliar uma lesão nervosa tipo axonotmese, após submeterem ratos ao exercício diário através do nado, durante uma hora, na fase aguda (vinte e quatro horas pós-lesão) e crônica (quatorze dias pós-lesão). Neste estudo o IFC foi mensurado nos dias 7,14,21 e 28 após a lesão (TEODORI, *et.al*, 2011). Os autores observaram que houve melhora na avaliação funcional dos animais que foram submetidos ao exercício, independentemente do início tanto na fase aguda quanto crônica. Destacam ainda que o grupo que realizou atividade na fase aguda logo após a lesão apresentou vantagem contra os demais grupos, tal vantagem foi observada nos valores do IFC, ainda que não apresentassem valores significativos.

Outro estudo que mostra o efeito benéfico na recuperação funcional de ratos é o de Santos e colaboradores (2010), que submeteram ratos com axonotmese do nervo isquiático a dois tipos de treinamento, resistência e força. Para o treino de resistência os autores utilizaram o nado como estratégia de exercício, forçando os animais a nadarem por cinco minutos diários. Como meio de promover o treino de força utilizou-se uma gaiola especial onde os animais tiveram que se elevar sobre as patas posteriores para se alimentarem e beberem água durante quatro horas por dia. Ambos os grupos realizaram o treino nos dias 5,10,15 e 20 após a lesão. Os autores concluem que houve melhora funcional nos grupos que realizaram treino de força e resistência contra o grupo controle, e esta melhora foi equivalente entre eles, porém, no vigésimo dia após a lesão todos os grupos apresentaram valores próximos de IFC, resultado este semelhante aos do nosso experimento.

Araújo (2008), submetendo ratos também ao nado forçado, mostrou que o exercício não retardou e nem acelerou o processo de regeneração, e que no 21º dia pós – lesão todos os grupos haviam chegado próximo ao parâmetro da normalidade. Quando confrontados com os nossos dados, estes resultados mostram uma semelhança parcial, uma vez que, em nossos experimentos o G2 e G3 mostraram ser superiores aos demais grupos no período de 14 dias pós – lesão. Após 21 dias a recuperação funcional apresentou valores próximos do normal para todos os grupos não havendo diferença estatística.

Podemos supor que as diferenças quando existentes entre os resultados de nosso estudo comparado com os demais, devem-se a inúmeras variáveis tais como tipo de exercício, intensidade e frequência com que foi empregado, já que, em nenhum dos trabalhos citados houve protocolo idêntico de treinamento.

A avaliação através do índice funcional do isquiático nos deu indícios de que o exercício possa de fato ajudar na processo de regeneração nervosa periférica, mesmo que de forma sutil como constatado e se tratando apenas da variável funcional.

A análise através da eletromiografia realizada nos mesmos períodos do IFC poderia nos ajudar oferecendo outro tipo de variável, que colaborasse no entendimento do que foi observado entre os grupos no resultado do IFC. Entretanto, ao observar os dados eletromiográficos não foi possível encontrar padrões que pudessem diferir entre os grupos, desta forma, uma correlação destes dados com os funcionais se tornou difícil.

Em síntese, nossos resultados eletromiográficos mostram que no período de vinte e quatro horas após a lesão, o traçado proveniente do lado experimental é marcado por um período de silêncio (sem atividade), a atividade espontânea começa a aparecer no traçado do lado experimental sete dias após a lesão, com quatorze dias notamos haver um sinal correspondente ao período de contração muscular observado a partir do lado sadio. Com vinte e um dias após a lesão, a contração muscular no lado experimental continua a ser observada, além disso, os potenciais espontâneos também estavam presentes, ainda que, a regularidade com que apareceram diminuiu.

Ao passo que procede a inervação após uma lesão, a fibra muscular tende a ter o seu potencial de membrana normalizado e não haverá mais despolarização espontânea. (BLUM, RUTKOVE; 2007).

Tanto para o grupo controle (G1) quanto para os experimentais a respeito daquilo que pudemos observar sobre os nossos registros, parece haver um padrão de recuperação dentro da normalidade, quando comparado com informações vindas de demais autores. Dados da literatura sustentam que não é possível observar potenciais espontâneos no período de 24 horas pós-lesão em ratos (FEINBERG, 2006). Herbison e colaboradores (1974) descrevem em seus resultados que os potenciais espontâneos não ocorreram até 72 horas após lesão nervosa, já com uma semana após a lesão é possível observar tais fenômenos.

Utilizamos o registro eletromiográfico também no lado sadio como forma de obter padrões tidos como normais que pudessem ser comparados com o lado contralateral do mesmo animal, quando este animal realizava seus comportamentos no interior da caixa. A respeito dos traçados obtidos no lado sadio, Gramsbergen e colaboradores (2000), relataram que um padrão eletromiográfico anormal por vezes pode ser observado no lado que não sofreu a lesão, quando o lado

contralateral encontra-se lesionado. Os autores relatam que este padrão pode ser devido a sobrecarga exigida ao lado sadio.

Em nossos traçados não relatamos nenhum tipo de anormalidade no lado sadio, tanto no período de repouso quanto no período de contração muscular. Pensamos que, devido aos ratos serem submetidos ao nado, a medida que progredia o exercício, o condicionamento físico do animal obtido no meio aquático se dava não somente no membro experimental, mas também no sadio. Portanto, alguma anormalidade detectável nos traçados eletromiográficos do lado sadio causada pela sobrecarga, poderia ser compensada devido a este fator. Deste modo, contra a informação apresentada por Gramsbergen e colaboradores (2000), não notamos nenhum tipo de potencial aberrante ou outra anormalidade no lado sadio ao longo de todo o processo de registro, somente alguns artefatos. Também é possível que a intensidade de nosso exercício não foi suficiente para gerar uma fadiga no animal. Vale ressaltar que tais autores mencionados, atribuíram a sobrecarga ao lado sadio, mas utilizaram em seus experimentos ratos submetidos a neurotmese, que demanda um período de recuperação maior quando comparado a ratos submetidos a axonotmese utilizados em nossa pesquisa.

Em suma, nossos dados eletromiográficos, quando analisados de forma isolada, mostram que o exercício não parece exercer efeito algum sobre o processo de regeneração, visto que, todos os grupos tanto exercitados quanto controle apresentaram características semelhantes, como a presença de potências de fasciculação, estes potências indicam que no 21º dia após a lesão o processo de reinervação ainda está em curso.

O exame eletromiográfico também não foi capaz de captar potências nascentes que segundo Feinberg (2006) são potências de baixa amplitude e curta duração indicativos de regeneração axonal em lesões crônicas.

Apesar do exame eletromiográfico não ter nos dado nenhuma informação diferente entre os grupos não se pode excluir esta ferramenta de análise, parece-nos que ao menos da forma que foi utilizada em nossos experimentos, a eletromiografia não foi sensível para detectar alguma alteração que pudesse estar ocorrendo entre os grupos. Ou ainda, podemos supor, que realmente não houve alterações causadas pelo exercício que pudessem ser detectáveis do ponto de vista eletrofisiológico.

Por fim, as variáveis estudadas no final do experimento (21 dias após a lesão) foram os músculos gastrocnêmios e cotos proximal e distal dos nervos isquiáticos lesionados, analisados através da histologia, bem como, o epicentro da lesão nervosa que foi processado de modo a nos oferecer dados biomoleculares.

A respeito da análise morfológica dos músculos gastrocnêmios, embora tenha – se realizado apenas a verificação visual, foi possível constatar nos quatro grupos, fibras musculares atroficas, caracterizadas pelo seu tamanho arredondado e espaçadas uma das outras, este espaçamento se dá devido a quantidade aumentada de tecido conjuntivo (BLUM, RUTKOVE; 2007).

Não se detectou nenhuma alteração substancial na morfologia do músculo após 21 dias no grupo controle e em nenhum dos grupos exercitados.

Nota-se que a recuperação do nervo até o 21º dia não foi totalmente conseguida, isso foi constatado quando em nossas lâminas, o tecido nervoso apareceu com grandes áreas de degeneração ao 21º dia. Porém, a recuperação funcional já havia sido alcançada como visto no registro do 21º dia do IFC. Este fato também foi observado por outros autores tal como Teodori e colaboradores (2011) e também Burnett e Zager (2004), os últimos asseguram que para o retorno da função não é necessário uma completa recuperação da arquitetura do nervo (BURNETT, ZAGER; 2004).

Nossos resultados a respeito dos elementos quantificados através da técnica de RT –PCR, mostraram valores muito discrepantes entre os grupos.

É sabido que fatores neurotróficos tais como o BDNF e o NGF são essenciais para o processo de regeneração nervosa após a lesão (BATISTA e ARAÚJO, 2010; CAMPBELL, 2008).

Um estudo de Meyer e colaboradores (1992), mensurou a expressão do RNAm tanto do BDNF quanto do NGF em nervos isquiáticos de ratos após lesão. Os autores mostram um aumento acentuado deste fatores, de forma progressiva até o 21º dia pós – lesão, mesmo quando o animal não é submetido a nenhum tipo de atividade (MEYER *et.a.*,; 1992).

Outros pesquisadores, utilizaram a quantificação de fatores neurotróficos em animais que sofreram algum tipo de intervenção após uma lesão nervosa. Um trabalho de Cobianchi e colaboradores mostram um aumento na expressão de BDNF e NGF em ratos exercitados através da esteira, contra ratos não exercitados. Os autores também alertam para o fato de que exercícios muito extenuantes podem ter efeitos deletérios

durante a reinervação, pela inibição na produção dos fatores neurotróficos, desta forma é aconselhável utilizar protocolos de exercícios mais brandos a fim de se conseguir efeitos positivos (COBIANCHI, *et.al*; 2013).

Wihelm e colaboradores (2012), Molteni e colaboradores (2004) e Gómez-Pinilla e colaboradores (2002), mostram que ratos exercitados tem um aumento na expressão dos fatores neurotróficos BDNF e NT – 3, todos estes autores utilizaram a esteira como meio de promover o exercício físico.

Como o padrão de expressão do BDNF e NGF foi semelhante em cada grupo podemos discuti-los em conjunto.

Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos citados anteriormente, para todos os grupos exercitados houve um aumento na expressão dos fatores neurotróficos mensurados. Este aumento foi visto de forma mais acentuada no G2 (exercitado diariamente), seguido do G4 que realizou exercício em dias alternados, já o G3 que realizou atividade tardia, apresentou menores níveis de expressão dentre os grupos exercitados. Parece-nos que a atividade realizada logo após a lesão influencia os níveis de expressão do BDNF e NGF, ao menos até o 21º dia, já que, os grupos com maior expressão foram os que iniciaram o exercício vinte e quatro horas após a lesão (G2 e G4). Outro fator é a frequência com que o exercício é feito, visto que, dentre os grupos que realizaram a atividade vinte e quatro horas após a lesão, o G2 apresentou valores maiores que o G4.

Como mostrado nos resultados do IFC, no registro referente ao 21º dia após a lesão, todos os grupos apresentaram parâmetros funcionais levemente superiores ao controle. Pode-se então fazer uma correlação positiva dos dados funcionais e biomoleculares uma vez que todos os grupos exercitados tiveram valores superiores de expressão do BDNF e NGF. O exercício foi capaz de aumentar a expressão de BDNF e NGF, mesmo no G4 que não teve uma recuperação funcional diferente do grupo controle.

Além dos fatores neurotróficos optamos por quantificar também a enzima iNOS e a citocina TNF – α , ambas com função pró-inflamatória discutida (YDENS, *et.al*; 2012).

Como visto em nossos resultados, o grupo controle mostrou uma expressão do RNAm referente a iNOS extremamente alta quando comparado aos grupos exercitados. Nossos resultados se assemelham aos encontrados por Lin, Hou e Chen (2011), tais autores quantificaram a iNOS em ratos após a lesão e mostram índices altíssimos de expressão decaindo ao longo do tempo, os mesmos autores concluem que esta

expressão em excesso não favorece o processo de regeneração nervosa, e que o papel da iNOS na regeneração ainda precisa ser totalmente elucidado (LIN, HOU, CHEN; 2011).

Em estudo conduzido por Shin e colaboradores (2005), ratos que tiveram supressão da iNOS apresentaram uma recuperação funcional mais rápida, observado nos valores do IFC.

Os demais grupos exercitados, quando comparados ao grupo controle mostraram uma expressão do RNAm referente a iNOS bem menores, sobretudo o G2, seguido do G4 e G3.

Nossos resultados a respeito do TNF – α também se assemelham ao padrão encontrado com a iNOS, ou seja, baixos nos grupos exercitados começando pelo G2, seguido do G4 e G3, e altos no grupo controle. Esses dados se assemelham a de outros estudos tais como Bobinski e colaboradores (2011), que ao analisar o nervo isquiático em diferentes grupos de animais, encontraram níveis de TNF – α diminuídos nos grupos que praticaram algum tipo de exercício, comparados com o controle não exercitado. Outras citocinas pró – inflamatórias tais como a interleucina 1 beta (IL – 1β) e a interleucina 6 (IL – 6) também foram mensuradas e mostraram redução em grupos exercitados (BOBISKI, *et.al*; 2011).

Podemos concluir, sobre a iNOS e o TNF – α , que o exercício quando iniciado logo após a lesão é capaz de causar uma supressão destes dois elementos, o grupo que apresentou menor expressão foi o G2 (exercitado diariamente), em segundo lugar o G4 que também iniciou o exercício vinte e quatro horas após a lesão passando a realiza-lo em dias alternados. O G3 apesar de realizar o exercício todos os dias, iniciou apenas no sétimo dia após a lesão portanto mostrou valores para o TNF – α e a iNOS superiores ao G4. Pode-se ainda concluir que mesmo iniciando sete dias após a lesão o exercício é capaz de agir reduzindo o nível tanto da iNOS quanto do TNF – α .

Analisando os elementos quantificados nos três grupos exercitados pode-se constatar uma correlação destes quatro elementos em cada grupo ou seja, o G2 foi o que apresentou maiores níveis de expressão de BDNF e NGF, em consequência foi também o que apresentou menores níveis de iNOS e TNF – α . O G3 apresentou menores níveis de BDNF e NGF e maiores níveis de iNOS TNF – α . Já o G4 apresentou valores intermédios entre o os grupos 2 e 3, sendo estes superiores ao G3 e inferiores ao G2 para o BDNF e NGF. Como também, valores inferiores ao G3 e superiores ao G2 para a iNOS e TNF – α .

Além disso, o padrão de expressão do BDNF e NGF difere quando se compara estes fatores no mesmo grupo isto é, o BDNF nos grupos 2, 3 e 4 apresentou expressão menor quando comparado ao NGF nos mesmos grupos. Acreditamos que esta diferença se dá pelo tipo desigual de expressão uma vez que o BDNF tem aumento de sua expressão chegando ao pico no sétimo e/ou décimo quarto dia após a lesão. Já o NGF apresenta um formato de expressão bifásico, atingindo um pico de expressão muito alto por volta da segunda semana pós – lesão e mantendo este pico por um longo tempo a medida que o BDNF tende a diminuir (FUNAKOSHI *et.al.*, 1993 ; HEUMANN, 1987).

Com nossos resultados seria precoce afirmar que o exercício realizado da forma como foi proposto é capaz de acelerar o processo de regeneração, apesar de alguns meios de análise subsidiarem esta hipótese, não podemos confirmá-la.

No entanto, não encontramos nenhum vestígio de que o exercício cause atraso ou seja prejudicial para o processo regenerativo, tal fato, vai contra os dados mostrados por alguns autores como, Tam e colaboradores (2001), Soucy e colaboradores (1996) e Gutmann e Jakoubek (1963), que encontraram em seus trabalhos efeitos negativos do exercício no processo de regeneração nervosa.

Diante do exposto, nossos dados apontam para um efeito benéfico do exercício no processo de regeneração nervosa periférica, embora os meios de análise nem sempre se correlacionem.

Não podemos afirmar categoricamente que houve um aumento na velocidade de regeneração nervosa nos grupos que realizaram exercício, mas, é evidente a ligeira melhora funcional mostrada por estes grupos bem como, o aumento na expressão de fatores neurotróficos e a supressão do TNF – α e da iNOS, ambos elementos com função pró – inflamatória discutida.

7 CONCLUSÃO

Os dados mostram uma aparente melhora funcional para os grupos exercitados, embora no 21º dia todos encontraram-se com parâmetros estatísticos semelhantes. Ainda que o índice funcional do isquiático seja considerado um dos melhores testes utilizados neste campo de estudo ele ainda não representa o padrão ouro indicativo de regeneração nervosa (KANAYA, FIRREL, BREIDENBACH; 1996).

Nossos traçados eletromiográficos apresentaram padrões semelhantes de evolução em todos os grupos. Nossa análise histológica também não mostrou diferenças muito substanciais.

Com relação aos dados biomoleculares observa-se um aumento acentuado na concentração dos fatores neurotróficos BDNF e NGF com conseqüente supressão da iNOS e do TNF – α nos grupos exercitados.

Em suma, a correlação das diversas variáveis tornou-se difícil, entretanto nosso trabalho compartilha deste mesmo problema com outros autores citados nesta discussão.

Finalmente, ressaltamos que novas estratégias de uso da eletromiografia devem ser buscadas como meio de tornar o teste mais sensível na detecção da desnervação/reinervação. Este é um recurso valioso que deve ser aprimorado para servir bem ao nosso campo de estudo.

8 REFERÊNCIAS

ALLEN, S.J.; DAWBARN, D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. **Clinical science**. v.2, p.175-191, 2006.

ALLODI, I.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. **Progress in neurobiology**. v.98, p.16-37, 2012.

ALRASHDAN, M.S.; PARK, J.C.; SUNG, M.A.; YOO, S.B.; JAHN, J.W.; LEE, T.H.; KIM, S.J.; LEE, H.H. Thirty minutes of low intensity electrical stimulation promotes nerve regeneration after sciatic crush injury in a rat model. **Acta neurol Belg**. v.2, p.168-179, 2010.

ARAÚJO, R.T. Efeitos do treinamento físico na água aquecida sobre a recuperação funcional e a regeneração nervosa periférica após lesão do nervo ciático em ratos machos adultos. 76 f. (Dissertação de mestrado em Neurociências) Programa de pós – graduação em ciências biológicas, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ARON, L.; KLEIN, R. Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. **Cell press, Trends in Neurosciences**. v.34, p. 88-100, 2011.

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plastic and reconstructive surgery**. v.1, p.129-136, 1989.

BASMAJIAN, J.V.; DE LUCA, C.J. Muscle alive: their function revealed by electromyography. 5th edition. William & Wikins: Baltimore, 1985.

BATISTA, K.T.; ARAÚJO, H.J. Microcirurgia das lesões traumáticas de nervo periférico do membro superior. **Rev. Bras. Cir. Plást**. v.25, p.708-714, 2010.

BATISTA, K.T.; ALMEIDA, C.E.F. Epidemiologia das lesões traumáticas tardias e nervo periférico do membro superior. **Ver. Soc. Bras. Cir. Plást**. v.23, p. 26-30, 2008.

BINNIE, C.; COOPER, R.; MAUGUIÈRE, F.; OSSELTON, J.; PRIOR, P.; TEDMAN, B. Clinical neurophysiology, Volume 1, EMG, Nerve conduction and evoked potentials, 2004. p. 82-92.

BLUM, A.S.; RUTKOVE, S.B. The clinical neurophysiology primer. New Jersey, 2007. p. 250-241.

BOBINSKI, F; MARTINS, D.F; BRATTI, T; MAZZARDO-MARTINS, L; WINKELMANN-DUARTE, E.C; GUGLIELMO, L.G.A; SANTOS, A.R.S. Neuroprotective and neuroregenerative effects of lowintensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v.194, p.337-348, 2011.

BOELTZ, T.; MEREDITH, I.; MATHIS, K.; NICOLINI, J.; POPLAVSKLI, K.; ROSE, S.J.; WILSON, E.; ENGLISH, A. Effects of treadmill training on functional recovery following peripheral nerve injury in rats. **J. Neurophysiol.** v.1, p. 2645-2657, 2013.

BURNETT, M.G.; ZAGER, E.L.; Pathophysiology of perupheral nerve injury: a brief review. **Neurosurg Focus**, v. 16, p. 1-7, 2004.

CAMPBELL, W.W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clin. Neurophysiol**, v.199, p.1951-1965, 2008.

CARENÕ, I.R.A.; USEROS, L.G.; TRIGUEROS, A.M. Motor unit action potential duration: measurement and significance. **Intech**. 2013.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. Óxido nítrico, revisão. **Acta cirúrgica brasileira**. v.17,p.417-423, 2002.

COBIANCHI, S.; DIAZ, L.C.; JARAMILLO, J.; NAVARRO, X. Differential effects of activity dependent treatments on axonal regeneration and neuropathic pain after peripheral nerve injury. **Experimental neurology**. v.240, p.157-167, 2013.

CONTI, G.; ROSTAMI, A.; SCARPINI, E.; BARON, P.; GALIMBERTI, D.; BRESOLIN, N.; CONTRI, M.; PALUMBO, C.POL, A.D. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. **Experimental neurology**. v.187, p.350-258, 2004.

CUNHA, N.B. Lesão nervosa periférica e envelhecimento: efeitos do treinamento em esteira 112 f. (Dissertação de mestrado em neurociências). Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2010.

DE LUCA, C.J. The use of surface electromyography in biomechanics. **J. Appl. Biomech.** v. 13, p.135-163, 1997.

DE MEDINACELLI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp Neurol.** v.77, p.634-643, 1982.

DEUMENS, R.; AHMET, B.; MEEK, M.F.; MARCUS, M.A.E.; JOOSTEN, E.A.J.; WEIS, J.; BROOK, G. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. **Progress in Neurobiology**, v.3, n.245-276, 2010.

EMIRANDETTI, G.F.S.; ZANON, R.G.; OLIVEIRA, A.L.R.; Spinal motoneuron synaptic plasticity after axotomy in the absence of inducible nitric oxide synthase. **Journal of neuroinflammation.** v.7, p.1-16, 2010.

ENGLISH, A.W.; CUCORANU, D.; MULLIGAN, A.; SABATIER, M. Treadmill training enhances axon regeneration in injured mouse peripheral nerves without increased loss of topographic specificity. **The journal of comparative neurology.** v.517, p. 245-255, 2009.

ERNFORS, P.; HENSCHEN, A.; OLSON, L.; PERSSON, H. Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat cord motoneurons. **Neuron.** v.2, p.1605-1613, 1989.

FEINBERG, J. EMG: Myths and facts, **Hospital for special surgery**, v.2, p. 19-21, 2006.

FORTI, F. Análise do sinal eletromiográfico em diferentes posicionamentos, tipos de eletrodos, ângulos articulares e intensidades de contração. 146 f. (Dissertação de mestrado em fisioterapia). Universidade metodista de Piracicaba, Piracicaba 2005.

FUNAKOSHI, H.; FRISÉN, J.; BARBANY, G.; TIMMUSK, T.; ZACHRISSON, O.; VERGE, V.M.K.; PERSSON, H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. **The Journal of Cell Biology**. v.2, p.455-465, 1993.

GASPARINI, A.L.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. Correlation between different methods of gait functional evaluation in rats with ischiatic nerve crushing injuries. **Ortop Bras**. v.5, p.285-289, 2007.

GODOY, B.O. Estudo eletromiográfico funcional da neurocondução motora em nervo ciático e músculo gastrocnêmio de ratos, antes e após neurotomia. 77 f. (Dissertação de mestrado em Bioengenharia) Instituto de pesquisa e desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo 2003.

GORIO, A; CARMIGNOTO, G; FINESSO, M; POLATO, P; NUNZI, G.M. Muscle reinnervation II. Sprouting synapse formation and repression. **Neuroscience**. v.3, p.403-416, 1983.

GORDON, T.; The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. **Neurosurg Focus**. v.3, p.1-10, 2009.

GRAMSBERGEN, A.; PAASSEN, J.I.; MEEK, M.F. Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervation of hindleg muscles. **Medical Physiology**, v.161, p.183-193, 2000.

GRIFFIN, J.W.; PAN, B.H.; POLLEY, M.A.; HOFFMAN, P.N.; FARAH, M.H. Measuring nerve regeneration in the mouse. **Experimental neurology**. v.223, p.60-71, 2010.

GÓMEZ-PINILLA, F.; YING, Z.; ROY, R.R.; MOLTENI, R.; EDGERTON, V.R. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **J. Neurophysiol**. v.88, p.2187-2195, 2002.

GUARDIA-MARRERO, C.L. El factor de crecimiento nervioso. Accion y características. Revision bibliográficas. **Revista cubana de investigacion Biomédica**. v.11, p.7-15, 1992.

GUTMANN, E.; JAKOUBEK B. Effect of increased motor activity on regeneration of the peripjeral nerve in youngrats. **Physiologia Bohemoslovenica**. v.12, p.463-468, 1963.

HALL, S. The response to injury in the peripheral nervous system. **The journal of bone and joint surgery**. v. 87, p. 1309-1319, 2005.

HEUMANN, R.; KORCHING, S.; BANDTLOW, C.; THOENEN, H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneural cells in response to sciatic nerve transection. **The Jorunal of Cell Biology**. v.2, p.1623-1631, 1987.

HERBISON, G.J.; JAWEED, M.M.; DITUNNOM J.F.; Effects of swimming on reinnervation of rat skeletal muscle. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. v.37, p.1247-1251, 1974.

IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**, v.25, p.101-121, 1996.

ILHA, J.; ARAUJO, R.T.; MALYSZ, T.; HERMEL, E.E.; RIGON, P.; XAVIER, L.L.; ACHAVAL, M. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabilitation and neural repair**, v.22, p. 355-366, 2007.

JENQ, C.B.; COGGESHALL, E.R. Numbers of regenerating axons in parent and tributary peripheral nerves in the rat. **Brain Research**. v.326, p.27 – 40, 1985.

JOHNSON, O.E.; ZOUBOS, A.N.; SOUCACOS, P.N. Regeneration and repair of peripheral nerves. **Injury**, v.36, p.24-29, 2005.

JOHNSON, O.E.; CHARCHANTI, A.; SOUCACOS, P.N. Nerve repair: Experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration. **Injury, int. J. care injured**. v.39, p.37-42, 2008.

JOSHI, M.; DESHPANDE, J.D. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. **International journal of biomedical research**. v. 10, p.81-97, 2010.

KANAYA, F.; FIRREL, J.C.; BREIDENBACH, W.C. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction and axon morphometry as indicators of regeneration. **Plast Reconstr Surg.** v.98 p.1264-1274, 1996.

KIERNAN, J. A Neuroanatomia humana de Barr. Barueri: Manole, 2003. P. 44-45.

KIM, Y.H.; GWAK, S.Y. SHIM, I. An electrophysiological method for quantifying neuropathic pain behaviors in rats: measurement of hindlimb withdrawal EMG magnitude. **J Physiol Sci.** v. 59, p.473-476, 2009.

KOERBER, H.R.; MIRNICS, K.; LAWSON, J.J. Synaptic plasticity in the adult spinal dorsal horn: the appearance of new functional connections following peripheral nerve regeneration. **Exp. Neurol.** v.200, p.468-479, 2006.

LARS, B.; DAHLIN, The biology of nerve injury and repair. **Journal of the American society for surgery of the hand,** v.4, n.3, 2004.

LEE, S.K.; WOLFE, S.W. Peripheral nerve injury and repair. **J. am acad. Orthop. Surg.** v. 8, p.243-252, 2000.

LEONI, A.S.L.; MAZZER, N.; GUIRRO, R.R.J.; JATTE, F.G.; CHEREGUINI, P.A.C.; MONTE-RASO, V.V. Estimulação elétrica de alta voltagem em nervo ciático de ratos. Estudo pelo IFC. **Acta Ortop. Bras.** v.20, p.93-97, 2012.

LEVY, D.; HOKE, A.; ZOCHODNE, D.W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in na animal model of neuropathic pain. **Neuroscience letters,** v.3, p.207-209, 1999.

LIN, H.; HOU, C.; CHEN, D. Altered expression of inducible nitric oxide synthase after sciatic nerve injury in rat. **Cell biochem biophys.** v.61, p.261-265, 2011.

LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. **Acta. Orthop. Scand.** v.58, p.145-169, 1987.

MADDURI, S.; GANDER, B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. **Journal of the peripheral nervous system**. v.15, p.93-103, 2010.

MARCHETTI, P.H.; DUARTE, M. Instrumentação em eletromiografia. Laboratório de Biofísica, escola de educação física e esporte, Universidade de São paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://demotu.org/pubs/EMG.pdf>>. Aceso em: 5 mai. 2013.

MARTINELLI, P.M.; CAMARGOS, E.R.S.; MORELL, G.; TAVARES, C.A.P.; NAGIC, P.R.A.; MACHADO, C.R.S. Rat heart GDNF: effect of chemical sympathectomy. **Histochem. Cell boil.** v.118, p.337-343, 2002.

MCDONALD, C.M.; CARTER, G.C.; FRITZ, R.C.; ANDERSON, M.W.; ABRESCH, R.T.; KILMER, D.D. Magnetic resonance imaging of denervated muscle: comparison to electromyography. **Muscle Nerve**. v.23, p.1431-1434, 2000.

VAN MEETEREN, N.L.U.; BRAKKEE, J.H.; HAMERS, F.P.T.; HELDERS, P.J.M.; GISPEN, W.H. Exercise training improves fuctional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. **Arch Phys Med Rehabil**. v.70, p. 70-77, 1997.

MENESES, M.S. Neuroanatomia aplicada. Rio de Janeiro: Guabara Koogan, 2011. P. 46-60.

MEYER, M.; MATSUOKA, I.; WETMORE, C.; OLSON, L.; THOENEN, H. Enhanced synthesis of brain derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: Different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. **The journal of Cell Biology**, v.1, p. 45-54, 1992.

MILLS, K.R. The basics of electromyography. **J neurol neurosurg psychiatrt.** n.76 suppl II. 32-35, 2005.

MOLTENI, R.; ZHENG, J.Q.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F.; TWISS, J.L. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.101, p.8473-8478, 2004.

MONTE-RASO, V.V.M. Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores. 66 f. (Tese de doutorado em ciências médicas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2006.

MUELLER, M.; WACKER, K.; RINGELSTEIN, B. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. **Am J Pathol.** v.159, p.2187-2197, 2001.

MUNN, J.; HERBERT, R.D.; HANCOCK, M.J.; GANDEVIA, S.C. Resistance training for strength: effect of number of sets and contraction speed. **Med Sci Sports Exerc.** v.9, p.1622-1626, 2005.

NAGAO, R.J.; LUNDY, Z.Z.; KHAING, C.E.; SCHIMIDT. Functional characterization of optimized acellular peripheral nerve graft in a rat sciatic nerve injury model. **Neurological research.** v.33, p.600-608, 2011.

NAVARRO, R.B. **Electromiografía.** Instrumentación Biomédica. Departamento Electrónica. Universidad Alcalá, 2005. Disponível em: <<http://neurofisio.hn.org/archivos/electromiografia.pdf>>. Acesso em: 20 jun 2013

NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Prog. Neurobiol.** v.82, p. 163-201, 2007.

NOBLE, J.; MUNRO, C.A.; PRASAD, V.S.; MIDHA, R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. **J. Trauma.** v.1, p.116-122, 1998.

PERRIN, F.E.; LACROIX, S.; AVILES-TRIGUEROS, M.; DAVID, S. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 alpha and interleukin-1 beta in wallerian degeneration. **Brain,** v.128, p.854-866, 2005.

PETRUSKA, J.C.; MENDELL, L.M. The many functions of nerve growth factor: multiple actions on nociceptors. **Neurosci let.** V.6, p.168-171, 2004.

PINILLA E.A.; UDINA, E.; JARAMILLO, J.; NAVARRO, X. Electrical stimulation combined with exercise increase axonal regeneration after peripheral nerve injury. **Experimental Neurology**. v.219, p.258-265, 2009.

POSSAMAI, F.; SIEKPO, C.M.; ANDRÉ, E.S. Investigação dos efeitos do exercício terapêutico sobre a regeneração nervosa periférica. **Acta Fisiatr**. v.17, p.142 – 147, 2010.

PRESTON, D.C.; SHAPIRO, B.E. Electromyography and neuromuscular disorders 2nd edition. Philadelphia: Elsevier, 2005.

QUAN, M.D.; BIRD, S. Nerve conduction studies and electromyography in the evaluation of peripheral nerve injuries. **Orthopaedic Journal, The University of Pennsylvania**, v.12, p.45-51, 1999.

RAHMAN, M.T.; UDDIN, M.S.; SULTANA, R.; MOUE, A.; SETU, M. Polymerase chain reaction (PCR): A short review. **AKMMC J**. v.4, p. 20-36, 2013.

ROBERTSON, D.G.E.; CALDWELL, D.E.; HAMILL, J.; KAMEN, G.; WHITTLESEY, S.N. Research methods in biomechanics. United States: Human Kinetics. 2004.

ROTSHENKER, S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. **Journal of neuroinflammation**. v.8, p.1-15, 2011.

SABATIER, M.; REDMON, N.; SCHWARTZ, G.; ENGLISH, A. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. **Exp. Neurol**. v.211, p.489-493, 2008.

SANTOS, C.M.T.; PEREIRA, C.U.; MORAIS, A.A.; SANTOS, E.A.S.; LIMA, P.T.R. The influence of endurance and strength physical practice in sciatic nerve recovery: experimental study. **Moreira JR**. n. 13 p.36-38, 2010.

SARZENSKI, T.M. Efeitos do treinamento físico sobre a regeneração do nervo isquiático no diabetes experimental. 167 f. (Tese de doutorado em Neurociências) Instituto de ciências básicas e da saúde, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2010.

SEDDON, H.J. Surgical disorders of the peripheral nerves, 2nd edition, Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975.

SEBBEN, D.A.; COCOLICHIO, F.; SCHIMITT, A.P.; CURRA, M.D.; VIEGAS, P.; TRES, G.L.; SILVA, J.L.B. Effect of neurotrophic factors on peripheral nerve repair. **Scientia medica**. v. 21, p.81-89, 2011.

SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The cytokine network of wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, and interleukin-1 beta. **J. Neurosci**, v.22, p. 2052-2060, 2002.

SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Rev. Neurocienc.** v.3, p. 226-233, 2007.

SKUP M.; DWORNIK, A.; MACIAS, M.; SULEJCZAK, D.; WIATER, M.; CZARKOWSKA-BAUCH, J. Long-term locomotor training up-regulates TrkB(FL) receptor-like proteins, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord. **Exp. Neurol.** v.176, p.289-307, 2002.

SOBRAL, L.L.; OLIVEIRA.; LARISSA, S.; TAKEDA, S.Y.M.; SOMAZZ, M.C.; MONTEBELO, M.I.L.; TEODORI, ROSANA, M. Immediate versus later exercises for rat sciatic nerve regeneration after axonotmesis: histomorphometric and functional analyses. **Brazilian journal of physical therapy**. v.12, p.311-316, 2008.

SOUICY, M.; SEBUM, K.; GARDINER, P. Is increased voluntary motor activity beneficial or detrimental during the period of motor nerve regeneration/reinnervation. **Can. J. Appl. Physiol.** v.21, p.218-224, 1996.

SUNDERLAND, S. Nerves and nerve injuries, 2nd edition, New York: Churchill Livingstone, p.133-138, 1978.

SUNICO, C.R.; LÓPEZ, M.B. Evidence for endothelial nitric oxide as a negative regulator of schwann cell dedifferentiation after peripheral nerve injury. **Neuroscience letters**. v.471, p.119-124, 2010.

TAM, S.L.; ARCHIBALD, V.; JASSAR, B.; TYREMAN, N.; GORDON, T. Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. **The Journal of neuroscience** v.15, p.654-667, 2001.

TAMADDONFARD, E.; FARSHID, A.A.; AHMADIAN, E.; HAMIDHOSEYNI, A. Crocin enhanced functional recovery after sciatic nerve crush injury in rats. **Iran J Basic Med Sci**. v.16, p.83-90, 2012.

TAMEEM, A.; STASHUK, D. Clinical quantitative electromyography. **Intech**. 2013.

TEODORI, R.M.; BETINI, J.; OLIVEIRA, L.S.; SOBRAL, L.L.; TAKEDA, S.Y.M.; MONTEBELO, M.I.L. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. **Neural Plasticity**. v.1, p.1-8, 2011.

TOTH, C. Peripheral nerve injuries atributable to sport and recreation. **Phys Med Rehabil**. v.20, p.77-100, 2009.

TREPEL, M. Neuroanatomia estrutura e função. Tijuca: Revinter, 2005. P. 19-23.

UDINA, E.; PUIGDEMASA, A.; NAVARRO, X. Passive and active exercise improve regeneration and muscle reinnervation after peripheral nerve injury in the rat. **Muscle e nerve**. v.43, p.500-509, 2011.

VAREJÃO, A.S.P.; MEEK, M.F.; FERREIRA, A.J.A.; PATRÍCIO, J.A.B.; CABRITA, A.M.S. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: Walking track analysis. **J neurosci Methods**. v.108, p.1-9, 2001.

VEAS, J.A.A.R. Utilização do teste de análise da marcha como método de avaliação funcional após lesões nervosas segmentares em nervo ciático de ratos. 109 f. (Dissertação de mestrado em clínica médica e

ciências da saúde) Faculdade de medicina, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2009.

VÖGELIN, E.; BAKER, J.M.; GATES, J.; DIXIT, V.; CONSTANTINESCU, M.A.; JONES, N.F.; Effects of local continuous release of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on peripheral nerve regeneration in a rat model. **Exp. Neurol.** v.199, p.348-353, 2006.

WALDRAM, M. Peripheral nerve injuries. **Trauma.** v.5, p. 79, 2003.

WIHELM, J.C; XU, M; CUCORANU, D; CHMIELEWSKI, S; HOMES, T; LAU, K.S; BASSEL, G; ENGLISH, A. et.al.; Cooperative roles of BDNF expression in neurons and schwann cells are modulated by exercise to facilitate nerve regeneration J. neurosci. v.32, p.2002-2009, 2012.

WOLTERS, M, M.; BINDERUPM M.T.; SCHMALBRUCH, H.; KRARUP, C.; Comparative electrophysiological functional, and histological studies of nerve lesions in rats. **Microsurgery.** v.6, p.508-219, 2005.

WONG, G.K.T.; MARSDEN, P.A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nefrol dial transplant.** v.11, p.215-220, 1996.

WU, Y.; ANGELES, M.M.; MARTÍNEZ; BALAGUER, P.O. Overview of the application of EMG recording in the diagnosis and approach of neurological disorders. **Intech.** 2013.

YDENS, E; CAUWELS, B.A.; GOETHALS, S.; PEERAER, L.; LORNET, G.; ALMEIDA-SOUZA, L.; GINDERACHTER, V.A.; TIMMERMAN, V.; JANSSENS, S. Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response. **Journal of Neuroinflammation,** v.9, p.176-181, 2012.

9 ANEXO A – Cópia digitizada do projeto original aprovado pelo comitê de ética



www.furb.br
UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU

ATESTADO

Atestamos, para os devidos fins, que o projeto de pesquisa intitulado, “ **Investigação dos efeitos do exercício terapêutico sobre a regeneração nervosa periférica. Sub-projeto 1: Atividade me roda motorizada e as repercussões funcionais na marcha de ratos Wistar submetidos à axonotmese. Sub-projeto 2: Atividade me roda motorizada e as repercussões morfológicas na regeneração ciática de ratos Wistar,** tendo como pesquisador responsável, Prof. Edison Sanfelice André. Projeto protocolado neste Comitê sob nº 017/08 e aprovado na reunião do dia 27/08/08.

Blumenau, 28 de agosto de 2008.

Prof. Dra. Simone Wagner Rios Largura
Coordenadora do Comitê de Ética na Experimentação com Animal-CEEA