



## 15° Congresso de Iniciação Científica

### ESTUDO MORFOMETRICO DE FIBRAS NERVOSAS REGENERADAS APÓS ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIATICO E EXERCÍCIO EM RATOS

#### Autor(es)

---

JOICE BETINI

#### Orientador(es)

---

Rosana Macher Teodori

#### Apoio Financeiro

---

PIBIC

#### 1. Introdução

---

Várias formas de treinamento em ratos têm sido estudadas com a finalidade de acelerar e ampliar a recuperação funcional do músculo após lesão nervosa periférica, porém, poucos estudos citam o impacto da atividade física na fase de desnervação (VAN MEETEREN et al., 1997). As conseqüências do exercício físico em músculos desnervados ainda são muito discutidas, especialmente quanto à intensidade e o melhor período para iniciar o exercício (SAKAKIMA et al., 2004). A maioria dos estudos discute os efeitos do exercício na fase de reinervação muscular, aproximadamente 2 semanas após a lesão nervosa, apontando a necessidade de um período de repouso antes do exercício (HERBINSON, JAWEED e DITUNNO, 1974; 1980; 1982; HIE et al., 1982), pois durante o curso da reinervação, quando o número de unidades contráteis é insuficiente ou quando o exercício é de alta intensidade, o músculo pode sofrer danos (HERBINSON, JAWEED e DITUNNO, 1974). Outros estudos relatam benefícios do exercício na fase precoce da reinervação, por favorecer o retorno da função sensório-motora, persistindo na fase tardia (VAN MEETEREN et al., 1997; SARIKCIOGLU e OGUZ, 2001).

#### 2. Objetivos

---

Analisar a influência de um protocolo de exercício de natação livre aplicado nas fases aguda e tardia da regeneração do nervo isquiático de ratos, sobre as características morfológicas do nervo regenerado.

#### 3. Desenvolvimento

---

Utilizou-se 25 ratos Wistar machos, pesando  $222 \pm 13g$ , , , obtidos no Biotério da FACIS-UNIMEP.

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=5):

Controle (C): Sem intervenção, permanecendo na gaiola por 33 dias.

Lesão (L): Esmagamento do nervo isquiático esquerdo, permanecendo na gaiola por 33 dias.

Lesão+NL1 (LN1): Esmagamento do nervo isquiático esquerdo + exercício de Natação Livre (NL) a partir do 1º dia pós-operatório (PO), durante 19 dias, respeitando finais de semana, permanecendo na gaiola até completar 33 dias PO.

Lesão+NL14 (LN14): Esmagamento do nervo isquiático esquerdo + exercício de Natação Livre (NL) a partir do 14º dia PO, durante 19 dias, respeitando finais de semana, até completar 33 dias PO.

Natação livre (N): Sem lesão, realizando exercício de Natação Livre (NL) durante 19 dias, respeitando finais de semana, permanecendo na gaiola até completar 33 dias.

Os animais dos grupos submetidos à natação passaram por um período de adaptação a água antes de iniciar o experimento, treinando num tanque com profundidade de 60cm e capacidade para 500 litros, adaptado para ratos, com temperatura de  $32 \pm 1^\circ C$ , por meio de um aquecedor de aquário, ligado a um termostato (HARRI e KUUSELA, 1986; CARVALHO, 2001). A adaptação iniciou-se com 20 min. no primeiro dia, tendo acréscimo progressivo de 10 min. a cada dia, atingindo 60 min. no 5º dia de natação.

Após cada sessão de exercício, os animais eram secados com toalhas e jato de ar quente produzido por um secador (TAIFF RS-3) e realocados nas gaiolas.

Os animais submetidos à lesão nervosa foram anestesiados com uma mistura de Ketalar® (50mg/ml) e Rompun® (2g/100ml), na proporção de 1:1, em dose de 0,3 mL/100g de peso corporal. Após tricotomia e assepsia, o nervo isquiático esquerdo foi exposto por uma incisão de 15 mm na região glútea e esmagado com pinça hemostática adaptada (4 pinçamentos de 20 seg. e intervalo de 1 seg.) (FERNANDES et al., 2005). Os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio de algodão 6-0 ETHICON.

Administrou-se 4µl de analgésico dipirona sódica 500 mg/mL (V.O.) e PVP (Povidine) – I 10% (uso tópico) no local da incisão, a cada 12 horas, no primeiro e segundo dia PO.

Após a lesão nervosa, os animais foram submetidos à natação no período vespertino por 30 min. diários, da mesma forma que na adaptação, de acordo com o grupo experimental e mantendo um intervalo de 24 horas.

Ao completar 33 dias, todos os animais foram anestesiados e o nervo isquiático esquerdo exposto e fixado in situ à  $4^\circ C$ , durante 10 min. com fixador de Karnovsky (1965) modificado. Após retirado, o nervo foi mantido em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas e pós-fixado em Tetróxido de Ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.3, por 2 horas, imerso em uranila 5% durante 24 horas, para coloração em bloco, desidratado em soluções crescentes (30% a 100%) de acetona, sendo a porção distal ao esmagamento incluída em resina Araldite (UEGAMA). Após coleta os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Foram obtidos cortes transversais de 1µm (ultramicrotomo LKB), corados com azul de toluidina a 1%. em solução de bórax a 1%, para microscopia óptica (REYNOLDS, 1963 apud TEODORI, 1998).

A análise morfométrica foi realizada em sistema analisador de imagens Image-Pro Plus 4.5-Media Cybernetics, obtendo-se o número de axônios, a espessura da bainha de mielina, o diâmetro da fibra e do axônio e a razão G.

Para verificar as pressuposições dos testes estatísticos, utilizou-se os testes Shapiro-Wilk, ANOVA-F (One-Way), seguidos de Tukey HSD, com nível de significância de 5%, processados no software BioEstat 4.0®.

#### 4. Resultados

Os grupos regenerados apresentaram maior número de axônios no segmento distal à lesão, quando comparados ao controle (Tabela 1). Este resultado reflete o comportamento de cada axônio lesado, que emite 2 a 3 brotos em direção ao músculo durante a regeneração (TOFT, FUGLEHOLM E SCHMALBRUCH, 1988; FAWCETT E KEYNES, 1990). Os grupos LN1 e LN14 apresentaram menor número de axônios em relação ao grupo L, sugerindo que a natação pode ter acelerado o processo de eliminação sináptica, que tem início 26 dias após a lesão (GORIO et al., 1983). Considerando que a análise do nervo neste estudo foi

realizada no 33º dia após a lesão, o processo de eliminação sináptica já estava em curso. Nos grupos LN1 e LN14 houve redução do diâmetro dos axônios em relação ao grupo Controle (77,2% e 78,9%, respectivamente), porém, os valores foram maiores que no grupo lesão (56,6%), sugerindo que o protocolo proposto acelerou a maturação axonal (Tabela 1). A diminuição do diâmetro dos axônios pode ocorrer pela privação de conexões terminais durante o processo de regeneração, colagenização aumentada, retração endoneural e efeitos tardios sobre o corpo celular (ANSSELIN, FINK E DAVEY, 1997). Houve também redução no diâmetro das fibras nervosas nos grupos desnervados em relação ao grupo controle. Nos grupos LN1 e LN14 os valores atingiram 68,5% e 70,7% dos valores controle, respectivamente, enquanto que o grupo lesão alcançou 57,1%, conforme valores apresentados na tabela 1. Acredita-se que, se a análise fosse realizada mais tardiamente, seria possível obter valores mais próximos aos encontrados no grupo controle, pois quando a lesão ocorre por compressão (axionotmese), o diâmetro dos axônios pode atingir os níveis controle após 6 meses (SCHRODER, 1972). A espessura da bainha de mielina apresentou-se diminuída nos grupos LN1 e LN14, assim como no grupo lesão (Tabela 1). É consenso que, por ser a espessura da bainha de mielina proporcional ao diâmetro do axônio por ela envolvido, quando o diâmetro axonal é diminuído após degeneração e regeneração nervosa, a espessura da bainha de mielina que o envolve também é diminuída (FRAHER e DOCKERY, 1998; ANSSELIN, FINK e DAVEY, 1997; SANTO NETO et al., 2004). A razão G está relacionada à velocidade de condução do impulso nervoso. Segundo Torch, Usson e Saxod (1989), valores de razão G entre 0.6 e 0.79 indicam velocidade de condução normal. Os resultados observados neste estudo indicam que o exercício de natação seja na fase imediata ou tardia da lesão, não influenciou a velocidade de condução do impulso nervoso (Tabela 1). A recuperação morfológica do nervo isquiático nos grupos LN1 e LN14 pode ter sido consequência da facilitação proporcionada aos músculos distais, comprometidos, pela ação dos músculos proximais, pelo mecanismo da irradiação (VOSS et al., 1987), uma vez que esta facilitação atua principalmente na recuperação neuromuscular (NITZ e BURKE, 2002). Segundo Seo et al. (2006), a ativação dos neurônios motores do membro contralateral, regulada pela medula espinhal, pode acelerar a regeneração axonal do membro acometido.

Sendo assim, o exercício pode ser iniciado na fase aguda da regeneração, pois acelera a maturação nervosa e a eliminação sináptica, como observado neste estudo. Além disso, há relatos de que o exercício iniciado nesta fase é capaz de aumentar a resistência à fadiga, restaurar as propriedades contráteis e a mecanosensibilidade do músculo (MARQUESTE et al., 2004), e promover a recuperação funcional (SEO et al., 2006; BYUN et al., 2005). Devido à escassez de trabalhos que utilizem a natação como recurso terapêutico após lesão nervosa periférica em ratos incluindo análise morfométrica, não foi possível comparar os resultados obtidos com outros estudos. Isso indica a necessidade de novas pesquisas para esclarecer os possíveis benefícios do exercício neste tipo de lesão, contribuindo para a prática fisioterapêutica.

## 5. Considerações Finais

O protocolo de natação aplicado, tanto na fase aguda como tardia da reinervação muscular, acelerou a maturação dos axônios regenerados e a eliminação sináptica. O exercício de natação iniciado na fase aguda é o mais indicado, por oferecer benefícios ao músculo e favorecer a recuperação funcional.

## Referências Bibliográficas

ANSSELIN, A. D.; FINK, T.; DAVEY, D.F. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with Schwann cells. **Neurophatol Appl Neurobiol**, v. 23, p. 387-398, 1997.

BYUN, Y.H., et al. Treadmill running promotes functional recovery and decreases brain-derived neurotrophic factor mRNA expression following sciatic crushed nerve injury in rats. **J sports Med Phys Fitness**, v. 45, n. 2, p. 222-228, 2005.

- CARVALHO, C.M.M. **Efeitos da mobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético.** São Paulo, 2001 (Dissertação de mestrado – EESC/FMRP/IQSC – Universidade de São Paulo).
- FAWCEET, J. W.; KEYNES, R. J. Peripheral nerve regeneration. **Ann Rev Neurosci**, v.13, p. 43-60, 1990.
- FERNANDES, K. C. B. G.; et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Rev Bras Fisiot**, São Carlos – SP, v.9, n. 2, p. 235-241, 2005.
- FRAHER, J.; DOCKERY, P. A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. **J Anat**, v. 193, n. 2, p. 195-201, 1998. GORIO, A. et al. Muscle reinnervation-II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neurosci**, v. 8, n. 3, p. 403-416, 1983.
- HARRI, M; KUUSELA, P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? **Acta Physiol Scand**, v. 126, p. 189-197, 1986.
- HERBINSON, G.J; JAWEED, M.M; DITUNNO, J.F. Effects of swimming on reinnervation of rat skeletal muscle. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.37, p. 1247-1251, 1974.
- HERBINSON, G. J; JAWEED, M. M; DITUNNO, J. F. Histochemical fiber type alterations secondary to exercise training of reinnervating adult rat muscle. **Arch Phys Med Rehabil**, v.61, p. 225-257, 1980a.
- HERBINSON, G. J; JAWEED, M. M; DITUNNO, J. F. Effect of activity and inactivity on reinnervating rat skeletal muscle contractility. **Exp Neurol**, v. 70, p. 498-506, 1980b.
- HERBINSON, G. J.; JAWEED, M, M; DITUNNO, J. F. Reinnervating Rat skeletal Muscle: 35% grade treadmill exercise. **Arch Phys Med Rehabil**, v.63, p. 313-316, 1982.
- HIE, H. B; VAN VIE, C. J; VERMCULEN-VAN, D. E. R. E. Twitch tension, muscle weight and fiber area of exercised reinnervating rat skeletal muscle. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 63, p. 608-612, 1982.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J Cell Biol**, v. 27, 137a, 1965.
- NITZ, J., BURKE, B. A study of the facilitation of respiration in myotonic dystrophy. **Physiother Res Int**, v. 7, n. 4, p. 228-238, 2002.
- MARQUESTE, T. et al. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. **J Appl Physiol**, v. 33, n. 9, p. 492-501, 2004.
- SAKAKIMA, H., et al. Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v. 14, p. 186-192, 2004.
- SANTO NETO, H. et al. Primary nerve repair by muscle autografts prepared with local anesthetic. **Microsurgery**, v. 24, n. 3, p. 188-193, 2004.
- SARIKCIOGLU, L, OGUZ, N. Exercise Training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. **Int J Neuroscience**, v. 109, p. 173-7, 2001.

SCHRODER, J. M. Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. **Brain Res**, v. 45, n. 1, p. 49-65, 1972.

SEO, T. B., et al. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. **J Amer Col Sports Med**. v. 38, n. 7, p. 1267-76, 2006.

TEODORI, R. M. et al. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. **Br J Plast Surg**, v. 51, p. 555-560, 1998.

TOFT, B. P; FUGLEHOLM, K.; SCHMALBRUCH, H. Axonal branching following crush lesions of peripheral nerves of rat. **Muscle & Nerve**, v. 11, p. 880-889, 1988.

TORCH, S.; USSON, Y.; SAXOD, R. Automated morphometric study of human peripheral nerve by image analysis. **Path Res Pract**, v. 185, p. 567-571, 1989.

VAN MEETEREN, N.L.U., et al. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. **Arch Phys Med Rehabil**, v.78, n. 1, p. 70-77, 1997.

VOSS, D. E.; IONTA, M. K.; MYERS, B. J. **Facilitação neuromuscular proprioceptiva**. 3.ed. São Paulo: Ed. Médica Panamericana, 1987.

## Anexos

---

**Tabela 1:** Valores médios  $\pm$ DP do número de axônios, diâmetro dos axônios ( $\varnothing$  axônios), diâmetro das fibras nervosas ( $\varnothing$  fibras), espessura da bainha de mielina e razão G, dos grupos experimentais ( $p < 0,05$ ), (#) difere do grupo Controle, (\*) difere do grupo Lesão, (†) difere do grupo Natação.

Grupos	Nº axônios	$\varnothing$ axônio ( $\mu$ m)	$\varnothing$ fibra ( $\mu$ m)	Espessura mielina ( $\mu$ m)	Razã
Controle	7867 $\pm$ 2433	6.36 $\pm$ 0.39	10.14 $\pm$ 0.37	1.89 $\pm$ 0.14	0.62 $\pm$
Lesão	21345 $\pm$ 2372#	3.60 $\pm$ 0.23#	5.80 $\pm$ 0.30#	1.09 $\pm$ 0.05#	0.62 $\pm$
Natação	9709 $\pm$ 1453*	6.42 $\pm$ 0.54*	10.21 $\pm$ 0.087*	1.89 $\pm$ 0.24*	0.62 $\pm$
LN1	13954 $\pm$ 2035# * †	4.91 $\pm$ 0.20# * †	6.95 $\pm$ 0.29# * †	1.02 $\pm$ 0.06# †	0.72 $\pm$ 0
LN14	12730 $\pm$ 2467# *	5.02 $\pm$ 0.29# * †	7.17 $\pm$ 0.48# * †	1.07 $\pm$ 0.13# †	0.70 $\pm$ 0