



5º Congresso de Pós-Graduação

ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA EM RATOS APÓS DESNERVAÇÃO E EXERCÍCIO NAS FASES IMEDIATA E TARDIA DA REGENERAÇÃO NERVOSA

Autor(es)

LARISSA SALGADO DE OLIVEIRA

Co-Autor(es)

SIBELE YOKO MATTOZO TAKEDA
LUCIANE LOBATO SOBRAL
JOICE BETINI
ROSANA MACHER TEODORI

Orientador(es)

ROSANA MACHER TEODORI

1. Introdução

Os nervos periféricos são altamente vulneráveis a lesão, refletindo em alterações motoras, sensitivas e autonômicas na região envolvida (ROBINSON, 2000). A regeneração do nervo periférico é normalmente estabelecida, no entanto é um processo lento, que depende da natureza e do grau da lesão, bem como da regeneração e maturação do nervo (VERDÚ et al., 2000; ROBINSON, 2000), o que interfere com a funcionalidade (EBERSTEIN e EBERSTEIN, 1996). Numerosos recursos fisioterapêuticos têm sido utilizados para viabilizar essa recuperação, como eletroestimulação fásica de baixa frequência (FERNANDES et al., 2005), eletroestimulação crônica de baixa frequência (DOW et al., 2004) e o exercício físico (HERBISON, JAWEED e DITUNNO, 1974; VAN MEETEREN et al., 1997; MARQUESTE et al., 2004; BYUN et al., 2005; SEO et al., 2006), entre outros. Dentre os citados, destaca-se o exercício físico como um recurso eficaz e bastante utilizado após lesão nervosa periférica, por proporcionar manutenção das propriedades musculares e manter o trofismo (POSSEBON et al. 2001; TANAKA, TSUBAKI e TACHINO, 2005). Entretanto, a literatura aponta controvérsia sobre o melhor período para realizar a atividade física, sendo que a maioria dos trabalhos discute os efeitos do exercício físico na fase de reinervação do músculo (aproximadamente duas semanas após a lesão nervosa), afirmando que deve haver um período de repouso antes do exercício (HERBISON, JAWEED e DITUNNO, 1974; SARIKCIOGLU e OGUZ, 2001), uma vez que o dano muscular pode ocorrer quando o número de unidades contráteis é insuficiente ou quando o exercício é de alta intensidade (HERBISON, JAWEED e DITUNNO, 1974). Por outro lado, o exercício realizado na fase de desnervação (12 horas ou um a três dias após a lesão nervosa) acelera o retorno da função sensório-motora

na fase inicial da recuperação da lesão (VAN MEETEREN et al., 1997) e melhora a recuperação funcional em ratos (BYUN et al., 2005; SEO et al., 2006). Para avaliar a recuperação das lesões nervosas periféricas nessas condições são utilizados vários meios como a eletrofisiologia, a morfometria e os estudos funcionais, dentre os quais o mais citado na literatura é o Índice Funcional do Ciático (IFC), que apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos por não ser invasivo e ser facilmente reproduzível, apresentando baixo custo e confiabilidade para avaliar o processo de regeneração (VAREJÃO et al., 2004), integrando o sistema sensorial e o motor (KANAYA, FIRRELL e BREIDENBACH, 1996). Considerando a controvérsia a respeito do momento mais adequado para iniciar o exercício após desnervação e a forma como é aplicado clinicamente, estudos experimentais com desnervação são de extrema importância, pois contribuem para a compreensão de alterações morfológicas e funcionais do sistema neuromuscular, favorecendo o desenvolvimento de intervenções terapêuticas voltadas à recuperação funcional.

2. Objetivos

Verificar a influência do exercício de natação livre iniciado nas fases imediata e tardia da regeneração sobre as características funcionais do nervo isquiático de ratos regenerado após axoniotmese.

3. Desenvolvimento

MATERIAL E MÉTODOS: Foram utilizados 15 ratos Wistar machos, pesando 222 ± 13 g, obtidos no biotério central da FACIS-UNIMEP. Os animais foram divididos em 3 grupos (n=5): Lesão (L), Lesão + exercício 24h + gaiola (LEG) e Lesão + gaiola + exercício (LGE) e mantidos durante 30 dias em gaiolas de polietileno, com livre acesso à água e ração comercial, sob temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas. Antes de iniciar o experimento, os animais dos grupos LEG e LGE foram adaptados à natação, em tanque com profundidade de 60 cm e capacidade para 500 litros, adaptado para ratos, com água rasa (30 cm de profundidade) (GOBATTO et al., 2001), sem carga e temperatura de $31 \pm 2^\circ$ C, mantida por meio de um aquecedor acoplado ao próprio tanque (HARRI e KUUSELA, 1986), durante 5 dias, iniciando com 20 minutos no primeiro dia, crescendo-se 10 minutos/dia e atingindo 1 hora no 5º dia (VOLTARELLI, GOBATTO e MELLO, 2002). Essa adaptação permitiu familiarizar o animal ao ambiente, reduzindo o estresse, sem promover adaptações físicas. Os animais submetidos à lesão nervosa foram anestesiados com uma mistura de Ketalar® (Cloridrato de Ketamina - 50 mg/ml) e Rompun® (Cloridrato de Tiazina - 2g/100ml), na proporção 1:1, (0,3 mL/100g de peso corporal) e uma incisão de aproximadamente 1,5 cm sobre a pele na região glútea esquerda permitiu visualizar o nervo isquiático, que foi submetido a quatro pinçamentos de 20 segundos (intervalo de um segundo entre eles) com pinça hemostática adaptada, de acordo com Fernandes et al. (2005). Em seguida, os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio de algodão 6-0 ETHICON. Os animais dos grupos LEG e LGE foram submetidos à natação em grupo, sem carga, profundidade em torno de 40cm e temperatura de $31 \pm 2^\circ$ C, 30 minutos/dia, 5 dias/semana, respeitando-se os finais de semana, realizado sempre no período vespertino e mantendo um intervalo de 24 horas entre cada sessão. O grupo LEG iniciou o exercício 24h após a lesão, durante 14 dias. Após esse período, permaneceram na gaiola até o 30º dia. O grupo LGE permaneceu na gaiola até o 13º dia, iniciando exercício no 14º dia pós operatório (PO), durante 14 dias. Após cada sessão de exercício, os animais eram secados com toalhas de pano e jato de ar quente, produzido por um secador (TAIFF RS-3®) e realocados nas gaiolas. Para o registro do Índice Funcional do Ciático (IFC), os animais foram previamente treinados a caminhar no dispositivo utilizado para análise, sendo posteriormente coletadas as impressões das patas posteriores de cada animal (DE MEDINACELI, FREED e WYATT, 1982). Para análise funcional da marcha, utilizou-se uma passarela de 8,2 x 42 cm, com um abrigo escuro na extremidade. A passarela foi revestida com papel sulfite e os animais foram colocados para caminhar, com as patas posteriores marcadas com tinta de impressão digital (VAREJÃO et al., 2004). Obteve-se o registro das impressões plantares das patas normal e experimental, nos períodos: pré-operatório, 7º, 14º, 21º e 28º dias PO. Utilizando-se um paquímetro digital (MITUTOYO®), foram obtidas as seguintes distâncias das patas experimental (E) e normal (N): Comprimento da Pegada (PL) - entre a extremidade do terceiro dedo e o calcâneo; Largura da Pegada (TS) - entre o primeiro e o quinto dedo e Largura Intermediária da Pegada (ITS) - entre o segundo e quarto dedo

(DE MEDINACELI, FREED e WYATT, 1982; BAIN, MACKINNON e HUNTER, 1989). Os valores obtidos em todos os períodos de análise foram aplicados na fórmula proposta por Bain, Mackinnon e Hunter (1989) e os resultados obtidos expressam a perda funcional em termos percentuais, sendo que o valor 0 (zero) representa a função normal ou ausência de disfunção e o valor -100 (menos cem) representa a perda total da função. No 31º dia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Para verificar as pressuposições dos testes estatísticos, utilizou-se o Teste de Shapiro-Wilk para normalidade dos dados. Em seguida, como os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o Teste de Friedman para comparação intragrupos da análise funcional da marcha e o Teste de Kruskal- Wallis para comparações intergrupos. Os dados foram processados no software BioEstat 4.0®, considerando $p < 0,05$.

4. Resultados

Na comparação intergrupos dos valores do IFC (Figura 1), todos os grupos apresentaram o mesmo padrão funcional, sendo que no período pré-operatório, os valores de IFC refletiram função normal. No 7º e 14º dia PO, esses valores diminuíram, refletindo perda funcional expressiva, enquanto entre o 21º e 28º dias PO os valores encontrados sugerem recuperação funcional. Não houve diferença significativa entre os grupos nos diferentes períodos de avaliação ($p > 0,05$). Neste estudo, os valores obtidos no período pré-operatório entre 0 e -20, estão de acordo com estudo de Dash et al. (1996), que citam estes valores refletindo uma função normal. Os valores de IFC próximo de -100 no 7º dia PO demonstram uma perda completa da função, o que indica falta de inervação neste período. A partir do 14º dia PO, esses valores se tornaram menos negativos, o que coincide com o período em que inicia a reinervação muscular, quando 25% das fibras musculares estão poliinervadas. No 21º dia PO, evidenciam-se valores de IFC próximos de zero, caracterizando recuperação funcional relacionada ao pico de poliinervação (GORIO et al., 1983). No 28º dia PO, esses valores refletem condição funcional compatível com a de nervos normais, pois a regeneração prossegue ocorrendo eliminação sináptica até conseqüente monoinervação (GORIO et al., 1983). Quando foi realizada uma comparação intragrupos, observou-se diferença significativa entre os tempos de análise. No grupo L e LGE verificou-se que o 7º e o 14º dia PO diferiram somente do período pré-operatório ($p < 0,05$), enquanto no grupo LEG a diferença ocorreu entre o 7º dia PO e o período pré-operatório, 21º e 28º dias PO ($p < 0,05$) (Tabela 1). Apesar da evolução semelhante entre os grupos em cada tempo ($p > 0,05$), quando se avaliou os dados de funcionalidade em cada grupo do período pré-operatório ao 28º dia PO, observou-se que a atividade iniciada na fase imediata da lesão acelerou a recuperação funcional, o que não ocorreu nos demais grupos. Isto reforça a importância da estimulação precoce, por oferecer benefícios ao nervo e ao músculo desnervado como aumento do número das fibras nervosas mielinizadas (SEO et al., 2006), aumento da resistência à fadiga, restauração das propriedades contráteis e da mecanossensibilidade do músculo (MARQUESTE et al., 2004), além de minimizar atrofia (POSSEBON et al., 2001; TANAKA, TSUBAKI e TACHINO, 2005), favorecer o retorno da função sensorio-motora na fase inicial (VAN MEETEREN et al., 1997), com conseqüente recuperação funcional após reinervação (VAN MEETEREN et al., 1997; BYUN et al., 2005; SEO et al., 2006).

5. Considerações Finais

A análise funcional da marcha de ratos submetidos à lesão por esmagamento do nervo isquiático mostrou que, independentemente da realização de exercício, ocorre um retorno gradual da função do nervo após a lesão. Entretanto, no grupo LEG a natação acelerou o processo de recuperação funcional a partir do 14º dia PO, o que sugere a indicação do exercício na fase aguda da lesão. Além disso, sabe-se que o exercício precoce minimiza os efeitos deletérios da desnervação sobre os músculos.

Referências Bibliográficas

[BAIN, JR.](#); [MACKINNON, SE.](#); [HUNTER, DA.](#) Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg**. v. 83, n. 1, p. 129-38, 1989.

- 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.
- DASH, H; et al. Evaluation of nerve recovery from minimal-duration crush injury. **Ann Plast Surgery**. n. 37, p. 526-31, 1996.
- DE MEDINACELLI, L; FREED, WJ; WYATT, RJ. An index of the function condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp Neurol**. v. 77, p. 6634-43, 1982.
- DOW, DE; et al. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. **Muscle Nerve**. n. 30, p. 77-86, 2004.
- EBERSTEIN, A; EBERSTEIN, S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? **Med. Sci. Sports Exerc**. v. 28, p. 1463-1469, 1996.
- 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.
- GOBATTO, C.A; et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem. Physiol**, v. 130, p. 21-27, 2001.
- 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.
- KANAYA, F; FIRRELL, JC; BREIDENBACH, WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. **Plast Reconstr Surg**. v. 98, n. 7, p. 1264–71, 1996.
- 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.
- POSSEBON, S; et al. Efeitos do Treinamento físico e da Creatina Magnésio em músculos desnervados de Ratos. **Rev Médica Hsvp**. v. 13, n. 29, p. 16-21, 2001.
- ROBINSON, L. R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle & Nerve**, v. 23, p. 863-868, 2000.
- SARIKCIOGLU, L, OGUZ, N. Exercise Training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. **Int J Neuroscience**, v. 109, p. 173-7, 2001.
- 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.
- TANAKA, S; TSUBAKI, A; TACHINO, K. Effect of Exercise Training after Partial Denervation in Rat Soleus Muscles. **J. Phys. Ther. Sci**. v. 17, p. 97-101, 2005.

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.

VAREJÃO A.S.P.; et al. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. **Neurol Res**. v. 26, n. 2, p.186-94, 2004.

[VERDÚ E](#); et al. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. **J Peripher Nerv Syst.** v. 5 , n.4, p.191-208, 2000.

VOLTARELLI, FA; GOBATTO, CA; MELLO, MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian J. Méd. and Biological Research**. v. 35, p. 1389-94, 2002.

Anexos

Tabela 1: Valores médios \pm DP do IFC nos grupos Lesão (L), Lesão + exercício 24h + Gaiola (LEG) e Lesão + Gaiola + exercício (LGE), nos diferentes períodos de análise.

	L	LEG	LGE
Pré-operatório	-16,18 \pm 14,24	-7,29 \pm 20,37	-9,78 \pm 12,40
7º dia	-77,62 \pm 25,17*	-91,25 \pm 30,20*	-77,32 \pm 25,46*
14º dia	-78,00 \pm 13,66*	-65,98 \pm 37,22	-72,13 \pm 15,66*
21º dia	-20,20 \pm 15,57	-17,14 \pm 11,72†	-29,01 \pm 12,12
28º dia	-14,66 \pm 8,70	-14,80 \pm 12,91†	-24,26 \pm 17,31

* p<0,05: comparado ao pré-operatório; † p<0,05: comparado ao 7º dia PO.

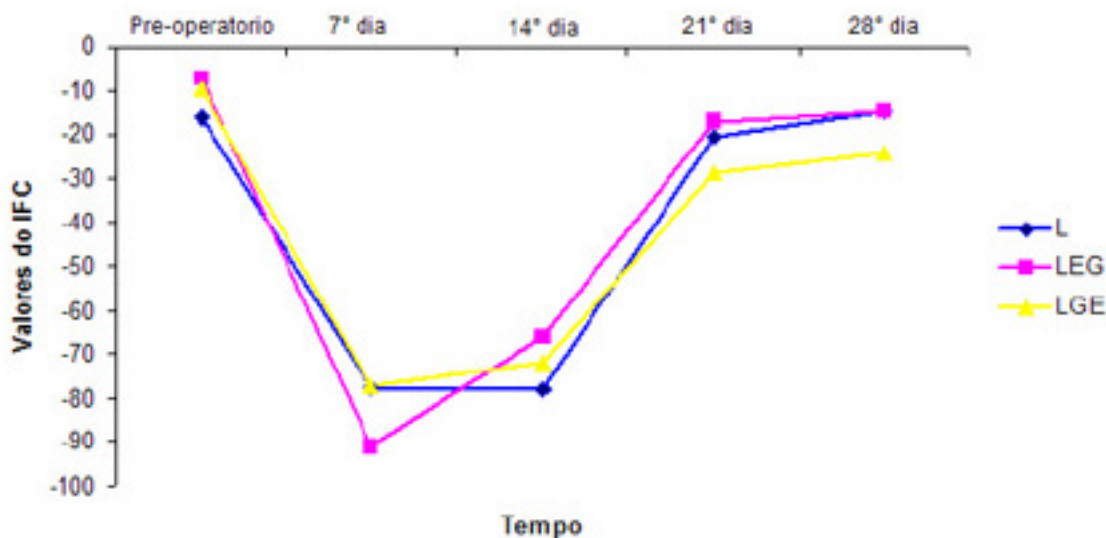


Figura 1 – Comparação intergrupos dos períodos de análise do Índice Funcional do Ciático (IFC): Lesão (L); Lesão + Exercício 24h + Gaiola (LEG); Lesão + Gaiola + Exercício (LGE); ($p > 0,05$).