



17º Congresso de Iniciação Científica

ANÁLISE DO DESLOCAMENTO VOLUNTÁRIO DE RATOS APÓS AXONOTMSE E EXPOSIÇÃO A AMBIENTE ENRIQUECIDO

Autor(es)

ANA MARIA BARBOSA NEGRINI ROMERO

Orientador(es)

ROSANA MACHER TEODORI

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPQ

1. Introdução

Análise do deslocamento voluntário de ratos após axoniotmese e exposição a ambiente enriquecido

Orientadora: Profa. Dra. Rosana M. Teodori

Bolsista: Ana Maria B. Negrini Romero

Estudos sobre a resposta do Sistema Nervoso Central (SNC) às lesões sugerem que estímulos ambientais, assim como a interação social, podem influenciar na plasticidade do sistema nervoso (Meltzer; Yabaluri; Deisseroth, 2005).

Modelos experimentais vem sendo empregados para estudar as repercussões de ambientes modificados e a interação com membros da mesma espécie sobre o sistema nervoso lesado. Steiner et al. (2005), utilizando um modelo experimental de doença de Parkinson, encontraram indícios de que o ambiente modificado associado ao exercício físico, aumentou a plasticidade celular. Segovia et al. (2005), também em modelo animal de lesão encefálica, verificaram que o ambiente enriquecido promovia aumento na produção de neurotransmissores. Will et al. (2004), relataram que o ambiente enriquecido, o exercício físico e o treinamento influenciavam o processo de recuperação funcional compensatória.

Karl et al. (2001) apontam que o sistema nervoso central é passível de modificações nas áreas corticais, como por exemplo, a possibilidade de novas conexões sinápticas, alteração na organização dos mapas corticais e variações nos mecanismos operacionais das células, visando estabelecer mecanismos de ajuste que diminuam os efeitos maléficos, tanto de lesões centrais quanto periféricas. Farrell Evans e Corbett (2001), investigando a possibilidade de o ambiente enriquecido atrasar a morte celular num modelo de isquemia em ratos idosos, constataram que animais submetidos ao ambiente enriquecido obtiveram melhora funcional considerável, porém, acompanhada de aumento na lesão cerebral. Os autores alertam sobre a necessidade de cuidados na abordagem terapêutica.

O sistema nervoso periférico apresenta capacidade de regeneração espontânea após algumas formas de lesão. Assim, após esmagamento, dentro de algumas horas o nervo começa a sofrer degeneração, que ao longo do tempo é seguida por regeneração e consequente reinervação muscular (ROBINSON, 2000). O prognóstico favorável dessas formas de lesão se deve à preservação dos envoltórios conjuntivos e da microcirculação do nervo após o esmagamento, apesar da perda de continuidade axonal (GORDON; SULAIMAN; BOYD, 2003; IJKEMA-PAASSEN et al., 2004). Mesmo assim, essas lesões podem ocasionar déficit sensitivo, motor e das funções autonômicas, que devem ser restabelecidas precocemente, pois quanto menor o tempo de reinervação, melhor o

prognóstico funcional. Entretanto, a recuperação funcional é um processo lento que depende da natureza, do grau da lesão e da regeneração nervosa (EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996).

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

A hipótese deste estudo é que a estimulação precoce por meio de exposição a ambiente enriquecido poderia favorecer a recuperação funcional.

2. Objetivos

Quantificar o deslocamento voluntário de ratos submetidos a esmagamento do nervo isquiático, após exposição individual a ambiente simples e enriquecido

3. Desenvolvimento

Foram utilizados vinte ratos Wistar (230 ± 18 g), distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=5): Controle Ambiente Enriquecido (CAE) - os animais não sofreram lesão nervosa e permaneceram individualmente em gaiola grande enriquecida; Controle Ambiente Simples (CAS) - os animais não sofreram lesão nervosa e permaneceram individualmente em gaiola grande simples; Lesão + Ambiente Enriquecido (LAE) - os animais sofreram esmagamento do nervo isquiático esquerdo e permaneceram individualmente em gaiola grande enriquecida; Lesão Ambiente Simples (LAS) - os animais sofreram esmagamento do nervo isquiático esquerdo e permaneceram individualmente em gaiola grande simples.

As gaiolas enriquecidas possuem dimensões de 38X60X24 cm, contando com 4 andares interligados por escadas e rampas, roda de exercício e dispositivos de comida e água móveis. As gaiolas simples apresentam dimensões de 30X13X44 cm e contam com dispositivos de comida e água fixos.

Os animais foram previamente anestesiados com uma mistura de Ketalar® (50mg/mL) e Rumpum® (2g/100mL), na proporção de 1:1, na dosagem de 0,3mL/100g de massa corporal – (i.m.). Uma incisão de 2 cm permitiu a exposição do nervo isquiático esquerdo. Em seguida, realizou-se o esmagamento do nervo – 4 pinçamentos de 20 segundos cada, com um intervalo de 1 segundo entre eles. Os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio monofilamento nylon (Ethicon 6.0).

Os animais foram distribuídos nas respectivas gaiolas, permanecendo durante 3 semanas. Durante esse período, nas gaiolas enriquecidas, os dispositivos de ração e água tiveram sua disposição alterada diariamente, de forma aleatória.

Os animais permaneceram no biotério sob ciclo claro/escuro 12/12 horas, em temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com ração padrão e água ad libitum.

O deslocamento voluntário foi quantificado a partir dos filmes coletados por uma Câmera de Vídeo Digital (Sony handycam – DCR-DVD610), posicionada superiormente à gaiola. As filmagens, com duração de 5 minutos/animal/dia foram realizadas em 3 momentos: no 2º, 3º e 4º dias pós-operatório (PO); 7º, 8º e 9º dias PO e 14º, 15º e 16º dias PO, sempre a partir das 18h00.

Ao final da terceira semana, os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical.

Os filmes obtidos nos diferentes tempos e grupos experimentais foram observados a partir dos dados de dimensão das gaiolas utilizadas (Gaiola Enriquecida - largura = 23 cm; comprimento = 37 cm; diagonal = 40,5 cm; distância entre os andares = 10,5 cm; comprimento da escada = 19 cm; comprimento da rampa = 19 cm; Gaiola Simples - largura = 27 cm; comprimento = 41 cm; diagonal = 48 cm).

Para a quantificação do deslocamento, considerou-se a posição do crânio do animal, no início e no final de cada movimento dentro da gaiola.

A partir da somatória dos valores de cada animal, obteve-se a média e o desvio padrão por grupo, que foram processados utilizando-se os testes de Shapiro Wilk, Anova-F One Way e Anova-F Two Way, seguido de post hoc Tukey, com nível de significância de 5%.

4. Resultado e Discussão

Os resultados do deslocamento voluntário dos animais dos diferentes grupos estão apresentados na tabela 1.

Na primeira semana após a lesão, o grupo controle exposto ao ambiente enriquecido apresentou maior deslocamento em relação a todos os demais grupos, demonstrando que o ambiente enriquecido proporcionou motivação ao deslocamento dos animais dentro da gaiola. Nos grupos submetidos a esmagamento do nervo isquiático (LAS e LAE), era esperado que o deslocamento fosse menor, especialmente na primeira semana, quando os músculos da pata posterior esquerda estavam desprovidos de inervação (GORIO et al.,

1983; TEODORI, 2007), pois nesse período ocorre uma redução drástica da função muscular, uma vez que a degeneração e regeneração nervosa ainda estão em pleno desenvolvimento (MARTINEZ; CANAVARRO, 2000). Van Meeteren et al. (1997) citam que após esmagamento do nervo isquiático ocorre uma diminuição de 80% da função. No grupo LAS o deslocamento correspondeu a 37,48% daquele observado no respectivo controle (CAS), enquanto no grupo LAE correspondeu a 64,16% do controle (CAE).

Nos primeiros dias após a lesão nervosa, a movimentação dos animais ocorre pelo apoio nos membros intactos, com “arrastamento” daquele cuja função foi severamente comprometida pela desnervação. Ao comparar o deslocamento entre os grupos nesse período, mesmo entre os desnervados, o grupo LAE apresentou valores superiores de distância percorrida. O deslocamento do grupo LAS foi 72,19% menor que o do grupo LAE. Os resultados demonstram que, apesar da restrição ao movimento, o deslocamento alcançado em ambiente enriquecido pode ter sido maior em função da presença de maiores oportunidades de exploração nesse ambiente.

Esse comportamento persistiu na segunda e terceira semanas após a lesão, sugerindo que os estímulos sensoriais oferecidos pelo ambiente teriam favorecido a exploração do espaço e evitado a acomodação dentro da gaiola (GENTILE; BEHESHTI; HELD, 1987).

A reinervação muscular ocorre somente a partir da segunda semana após a lesão, quando as fibras mais superficiais do músculo (correspondendo a 25% das unidades motoras) já se apresentam reinervadas (GORIO et al., 1983). Dezenove dias após a lesão o músculo apresenta 52% da força de contração isométrica em relação à pata contralateral (CARMIGNOTO et al., 1983). Após 25 dias, a força é recuperada em 80% e é considerada praticamente normal.

Na terceira semana após a lesão, o deslocamento dos animais no grupo LAS atingiu 80,82% dos valores de seu respectivo controle (CAS). Fato semelhante ocorreu no grupo LAE, que alcançou 83% dos valores controle (CAE). Esses resultados reforçam as afirmações de Fawcett e Keynes (1990) e Burnett e Zager (2004), de que a regeneração nervosa após axoniotmese ocorre espontaneamente e, segundo Gorio et al. (1983), entre o 21º e o 25º dia, ocorre o pico de poliinervação, sendo a acetilcolina liberada na junção neuromuscular, garantindo a recuperação da função muscular durante a reinervação. Os dados observados no período de 3 semanas pós-lesão mostram que a agilidade para se deslocar na gaiola progride naturalmente durante a regeneração nervosa e reinervação muscular, entretanto, ao comparar os grupos lesados em diferentes ambientes (LAS e LAE), o grupo LAE apresentou deslocamento significativamente superior nesse período, sugerindo uma influência positiva do ambiente enriquecido.

Takeda et al. (2008) utilizaram o Índice Funcional do Ciático (IFC) para avaliar a recuperação da função para a marcha em ratos submetidos a axoniotmese. O ambiente enriquecido não promoveu modificações no processo de recuperação funcional.

Neste estudo, em que a quantificação foi realizada a partir da análise dos filmes demonstrando o deslocamento dos animais, foi possível verificar a influência positiva do ambiente enriquecido sobre a recuperação funcional. Apesar do IFC ser um método qualitativo eficiente de avaliação do retorno funcional após lesão nervosa periférica (VAREJÃO et al., 2004) detectando extremos no desempenho da função (KANAYA; FIRREL; BREIDENBACH, 1996), sua validade é ainda questionável (VAREJÃO et al., 2004). É possível que não seja sensível o suficiente para detectar alterações sutis, como as observadas pelo método de investigação proposto neste estudo.

5. Considerações Finais

A exposição ao ambiente enriquecido promoveu estímulos que permitiram acelerar a recuperação funcional após axoniotmese.

Referências Bibliográficas

- KARL, A; BIRBAUMER, N.; LUTZENBERGER, W.; COHEN, L.G.; FLOR, H. Reorganization of motor and somatosensory cortex in upper extremity amputees with phantom limb pain. *J Neurosci*. v. 21, n. 10, p. 3609-3618, 2001.
- BURNETT, MG; ZAGER, EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16 (5): 1-7.
- CARMIGNOTO, G; FINESSO, M; SILIPRANDI, R; GORIO, A. Muscle reinnervation – I. Restoration of transmitter release mechanisms. *Neurosci*. 1983; 8(3): 392- 401.
- EBERSTEIN, A; EBERSTEIN, S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med. Sci. Sports Exerc*. 1996; 28: 1463-1469.
- FARRELL, R.; EVANS, S.; CORBETT, D. Environmental enrichment enhances recovery of function but exacerbates ischemic cell death. *J. Neuroscience*, v. 107, n. 4, p. 585-592, 2001.
- FAWCETT, JW; KEYNES, RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 1990; 13: 43-60.
- GENTILE, AM; BEHESHTI, Z; HELD, JM. Enrichment versus exercise effects on motor impairments following cortical removals in rats. *Behav Neural Biol*. 1987. 47: 321-332.
- GORDON, T.; SULAIMAN, O.; BOYD, J.G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst*. 2003; 8: 236-250.
- GORIO, A; CARMIGNOTO, G; FINESSO, M; POLATO, P; NUNZI, MG. Muscular reinnervation -II Sprouting, synapse formation and repression. *Neuroscience*, [S.L]. 1983; 8 (3): 403-16.
- IJKEMA-PAASSEN, J; JANSSEN K; GRAMSBERGEN, A; MEEK, MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and

effect evaluation. *Biomaterials*. 2004; 25: 1583-1592.

- KANAYA, F; FIRRELL, JC; BREIDENBACH, WC. Sciatic Functional Index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996; 98(7): 1264-1271.
- MARTINEZ, AMB; CANAVARRO, S. Early myelin breakdown following sural nerve crush: a freeze-fracture study. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33 (12) 1477-1482.
- MELTZER, LA; YABALURI, R; DEISSERROTH, K. A role for circuit homeostasis in adult neurogenesis. *Trends in Neurosci*, v. 28, n. 12, p. 653-660, 2005.
- ROBINSON, LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & Nerve*. 2000; 23: 863-868.
- ROSENZWEIG, MR, KRECH, D; BENNET, EL. Enriched environment: facts, factors, and fantasies In: Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training. *Progr Neurol*. 2004; 72: 167- 182.
- SEGOVIA, G; YAGÜE, AG; GARCÍA-VERDUGO, JM; MORA, F. Environment enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res Bull*. 2005: 1-7.
- STEINER, B; WINTER, C; HOSMAN, K; SIEBERT, E; KEMPERMANN, G; PETRUS, DS; et al. Enriched environmental induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in 6-OHDA rat model of Parkinson`s disease. *Exp Neurol*. 2005; 1-10.
- TAKEDA, SYM; OLIVEIRA, LS; SOBRAL, LL; SOMAZZ, MC; MONTEBELO, MIL; TEODORI, RM. Regeneración nerviosa periférica en ratones expuestos a un ambiente enriquecido. *Rev Neurol*. v. 47, n. 4, p.185-190, 2008.
- TEODORI, RM. Influência da estimulação elétrica de baixa frequência sobre a reinervação muscular. Relatório Científico apresentado à FAPESP referente a projeto regular de pesquisa (processo nº 05/52720-0).
- VAREJÃO, ASP; MELO-PINTO, P; FILIPE, VM; BULAS-CRUZ, J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res*. 2004; 26: 186-194.
- WILL, B; GALANI, R; KELCHE, C; ROSENZWEIG, MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training. *Progr Neurol*. 2004; 72: 167- 182.