

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**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**

RAFAELA TROIS DE ARAUJO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

**Porto Alegre
2008**

AGRADECIMENTOS

À Professora Matilde pela orientação, compreensão e acolhida em seu laboratório;

Aos professores e funcionários do PPG-Neurociências pelo ensino e auxílio durante o mestrado;

Aos meus colegas do laboratório de Histofisiologia Comparada pela amizade e companheirismo durante este tempo, especialmente ao Jocemar, a Taís e a Patty, pela ajuda, apoio e amizade;

À Micheli que me auxiliou com seus conhecimentos técnicos quando precisei;

Ao Marcos e à Valentina pelo amor, compreensão, carinho, apoio e paciência durante esses dois anos de mestrado;

Às minhas irmãs amigas que sempre me incentivaram e se orgulharam de mim;

Às minhas amigas irmãs que me apoiaram com suas palavras nas piores horas, em especial a Dani, Vanessa e Jana;

Aos meus pais que sempre me incentivaram e apoiaram minhas escolhas;

À todos aqueles que de alguma forma estiveram envolvidos junto comigo nesta etapa;

À UFRGS pela oportunidade de realizar este trabalho;

À CAPES, pela bolsa concedida durante o período de estudo.

Obrigada!

“O essencial é invisível aos olhos”

Sain't Exupery

RESUMO

Lesões experimentais do nervo ciático, seguidas de exercício físico, têm sido usadas para induzir à degeneração nervosa periférica, como um modelo de neuropatia periférica, e estudar as alterações degenerativas e os processos regenerativos que ocorrem após a lesão. Entretanto, parâmetros como tempo e especificidade do exercício e seus efeitos sobre a regeneração ainda não estão bem esclarecidos. Neste estudo, analisamos os efeitos do exercício físico moderado na água aquecida durante cinco semanas, na regeneração do nervo ciático, após uma lesão nervosa por compressão, sendo para isso utilizado análises funcional, bioquímica e morfométrica. Os ratos foram divididos em 3 grupos, sendo um controle, um sedentário e um nado livre. Os grupos sedentário e nado livre foram submetidos a lesão do nervo ciático direito por esmagamento, sendo que, o grupo nado livre, após a lesão, foi submetido a cinco semanas de treinamento na água aquecida 31° C, iniciado com 10 minutos até alcançar 1 hora de nado livre. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o exercício físico na água aquecida não interfere na recuperação funcional dos ratos, visto que, tanto os animais treinados quanto os animais sedentários recuperaram a função do membro posterior direito. A atividade da enzima acetilcolinesterase nos grupos experimentais não apresentou diferença significativa entre eles, porém foram diferentes do controle. Este resultado se repetiu em relação a diferenciação

morfológica dos nervos em regeneração, onde os grupos sedentário e nado livre não apresentaram diferença significativa, mas permaneceram diferentes do grupo controle.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Estrutura dos Nervos Periféricos.....	4
1.2 Lesão nos Nervos Periféricos.....	7
1.3 Exercício Físico e Lesão Nervosa Periférica	13
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Modelo Animal.....	21
3.2 Tratamento da Amostra.....	21
3.3 Procedimento Cirúrgico	22
3.4 Tanque de Água	23
3.5 Treinamento	24
3.6 Índice de Funcionalidade do Ciático.....	26
3.7 Coleta de Material para Análises Histológica e Bioquímica.....	29

3.7.1 Histologia e Morfometria do Nervo ciático	30
3.7.2 Detecção Bioquímica da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase no Músculo Gastrocnêmio	32
3.8 Análise Estatística	33
4 RESULTADOS	34
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	55
7 REFERÊNCIAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh.....	Acetilcolina
AChE.....	Acetilcolinesterase
ACTH.....	Hormônio Adrenocorticotrófico
ANOVA.....	Análise de Variância
BDNF.....	Fator neurotrófico Derivado do Encéfalo
CON.....	Controle
EIT.....	<i>Experimental Intermediary Toe</i>
EPL.....	<i>Experimental Print Length</i>
ETS.....	<i>Experimental Total Spreading</i>
IFC.....	Índice de Funcionalidade do Ciático
L1.....	Laminina 1
N-CAM.....	Molécula Neural de Adesão Celular
NT.....	Neurotrofina
NIT.....	<i>Normal Intermediary Toe</i>
NPL.....	<i>Normal Print Length</i>
NTS.....	<i>Normal Total Spreading</i>
NGF.....	Fator de Crescimento Neural
NL.....	Nado Livre
OsO4.....	Tetróxido de Ósmio

SED.....	Sedentário
SNC.....	Sistema Nervoso Central
SNP.....	Sistema Nervoso Periférico
TF.....	Tampão Fosfato
TrKA.....	Tirosino-quinase A
TrKB.....	Tirosino-quinase B
TrKC.....	Tirosino-quinase C

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte transversal de um nervo periférico	5
Figura 2. Micrografia eletrônica de corte transversal de nervo.....	7
Figura 3. Ilustração da degeneração e regeneração de um axônio periférico.....	11
Figura 4. Sinalização da regeneração do SNP.....	12
Figura 5. Imagens digitalizadas do procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo ciático direito	23
Figura 6. Tanques para natação	24
Figura 7. Gráfico da progressão do treino ao longo das semanas de treinamento do estudo.....	25
Figura 8. Rato nadando durante o treinamento.....	25
Figura 9. Esquema temporal das avaliações do IFC.....	26
Figura 10. Pista para marcação da região plantar dos membros posteriores dos ratos durante a marcha	27
Figura 11. Marcação da região plantar dos membros posteriores dos ratos.....	27
Figura 12. Exemplo das marcações da região plantar controle e da região plantar experimental.....	29
Figura 13. Comparação da recuperação funcional determinada pela Índice de Funcionalidade do Ciático (IFC) antes do treinamento de natação, durante o período de treino e após o término do treinamento.....	36
Figura 14. Imagens digitalizadas de um corte transversal do nervo ciático normal	37

Figura 15. Imagem digitalizada de um corte transversal do nervo ciático lesionado de ratos sedentários.....	38
Figura 16. Imagem digitalizada de um corte transversal do nervo ciático lesionado de ratos treinados	39
Figura 17. Gráfico de resultados da medida da densidade das fibras mielínicas do nervo ciático direito	41
Figura 18. Gráfico de resultados da medida da espessura da bainha de mielina das fibras nervosas do nervo ciático direito.....	41
Figura 19. Gráfico de resultados da medida da área média das fibras mielínicas do nervo ciático direito	42
Figura 20. Gráfico de resultados da medida do diâmetro médio das fibras mielínicas do nervo ciático direito.....	42
Figura 21. Gráfico de resultados da medida do diâmetro médio dos axônios do nervo ciático direito	43
Figura 22. Gráfico de medida do grau de mielinização, uma estimativa entre o diâmetro da fibra e o diâmetro do axônio	43
Figura 23. Atividade da AChE no músculo gastrocnêmio de ratos sedentários e treinados.....	44

1-INTRODUÇÃO

Diferentemente do Sistema Nervoso Central (SNC), lesões do Sistema Nervoso Periférico (SNP) apresentam uma maior capacidade de regeneração espontânea, determinada, principalmente, por um ambiente permissivo ao crescimento axonal (GORDON *et al.*, 2003). Isso se dá devido às diferenças estruturais entre o SNP e o SNC. As células de Schwann, presentes nos nervos periféricos, são as células gliais primárias, que embainham e mielinizam os axônios e também formam a lâmina basal. No SNC, os oligodendrócitos embainham e mielinizam os axônios, mas não produzem uma lâmina basal em associação com os axônios, sendo o maior obstáculo para regeneração no SNC, a associação da mielina com moléculas inibitórias e a cicatriz glial induzida pela lesão (CHEN *et al.*, 2007).

No SNP não existe formação de cicatriz glial, pela ausência de astrócitos, embora moléculas inibitórias associadas à mielina, presentes no SNC, tais como glicoproteínas e seus receptores, também sejam encontrados no SNP. Porém, após a lesão no SNP, as células de Schwann e os macrófagos removem rapidamente os restos de mielina. Essa reação local diferenciada é um fator importante que contribui com a capacidade de regeneração do SNP (CHEN *et al.*, 2007). Após uma lesão nervosa periférica inicia-se um processo de degeneração conhecido como degeneração walleriana, sendo o segmento

lesado fagocitado, a partir do primeiro nódulo de Ranvier intacto (TRUMBLE, 2000). As células de Schwann proliferam e formam um pilar por onde os axônios em regeneração irão migrar até sua célula-alvo (IDE, 1996; DEZAWA *et al.*, 1998).

Essa capacidade de regeneração do SNP às vezes gera uma idéia falsa de que os nervos periféricos regeneram e reinervam facilmente seus alvos. Todavia, a recuperação funcional dos pacientes nem sempre é obtida clinicamente, pois existe uma janela temporal para a regeneração axonal, que normalmente é curta para que os axônios lesionados regenerem, e as células de Schwann proporcionem essa regeneração por longas distâncias (GORDON *et al.*, 2003). Essa distância que os axônios devem regenerar, normalmente é longa em humanos, e a taxa de crescimento é de aproximadamente 1mm/dia, o que pode levar a uma atrofia do tubo endoneural além da degeneração dos músculos desnervados com perda funcional acentuada (TONGE; GOLDING, 1993). O progressivo declínio na habilidade dos motoneurônios de promover o crescimento axonal, juntamente com a atrofia e conseqüente falha das células de Schwann, desprovidas cronicamente do contato com o axônio em prover um ambiente favorável ao crescimento axonal, são os principais fatores contribuintes para a redução da capacidade regenerativa dos nervos periféricos e uma pobre recuperação funcional após a lesão (GORDON *et al.*, 2003).

Diferentes condições patológicas podem afetar o SNP, resultando em alterações sensoriais, motoras e vegetativas, que podem ter uma representação clínica de importância significativa (FREDERICKS, 1996). A lesão periférica pode ser ocasionada por esmagamento, compressão, trauma contuso ou por objetos penetrantes, causando uma lesão completa ou parcial

do nervo (COLOHAN *et al.*, 1996). Toda perda ou diminuição da sensibilidade e da motricidade no território inervado, resultante de uma lesão de nervo periférico, irá conduzir a um comprometimento das atividades diárias de um indivíduo lesado. A dor, os transtornos e as incapacidades, podem resultar no afastamento do indivíduo das funções diárias, e este afastamento gera um alto custo econômico, sendo, estes fatores, determinantes para uma recuperação precoce dos pacientes após uma lesão nervosa periférica (WHITING; ZERNICKE, 2001).

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados com o propósito de propiciar maiores conhecimentos sobre a regeneração nervosa, assim como buscar estratégias que possibilitem uma regeneração mais rápida com adequada recuperação funcional. Entre estes, a lesão do nervo ciático em ratos tem sido o modelo mais estudado (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004). Embora a taxa de regeneração axonal em ratos seja de 3-4 mm/dia e a distância a ser regenerada seja menor que no homem (TONGE; GOLDING, 1993), o que possibilita uma rápida reinervação das estruturas alvo, este modelo proporciona informações sobre o processo de diferenciação celular das fibras nervosas em regeneração e da recuperação funcional, possibilitando aprimorar técnicas que acelerem a regeneração neural. Além disso, o nervo ciático de ratos provê uma fonte de estudo do tecido nervoso periférico de mamíferos que mostra detalhes celulares indistinguíveis dos nervos humanos (MACKINNON *et al.*, 1985), além de apresentar um tronco nervoso adequado para manipulação cirúrgica e lesões experimentais na porção média da coxa (RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Diferentes estudos têm sido realizados utilizando o modelo de esmagamento do nervo ciático de ratos, empregando exercícios com o propósito de estimular a regeneração nervosa, e promover a recuperação funcional. Tais estudos encontram diversos resultados, os quais muitas vezes não apresentam semelhança, levando a novas pesquisas, na busca de novas respostas (VAN MEETEREN *et al.*, 1997 a e b).

1.1 Estrutura dos nervos periféricos

O sistema nervoso periférico engloba os axônios dos neurônios motores e sensoriais e os neurônios dos gânglios raquidianos e seus homólogos dos pares cranianos, constituindo os nervos espinhais e cranianos, além dos plexos e troncos nervosos periféricos até suas ramificações terminais intramusculares, bem como o sistema nervoso vegetativo (SNV) (VALLAT; MAGY, 2005). Cada nervo periférico é composto de fibras nervosas, camadas de tecido conjuntivo fibroso e vasos sanguíneos (FREDERICKS, 1996).

As fibras nervosas incluem axônios de neurônios motores somáticos (α e γ), fibras aferentes somáticas dos músculos, pele e articulações, além de fibras do sistema neurovegetativo. Assim, um nervo periférico contém tanto fibras mielínicas quanto fibras amielínicas, sendo os axônios das fibras mielínicas cobertos por uma bainha de mielina (Figura 1), formada por camadas concêntricas da membrana plasmática das células de Schwann, interrompidas apenas nos nódulos de Ranvier, entre uma célula e outra (JOHNSON *et al.*, 2005; FREDERICKS, 1996). A bainha de mielina isola e protege o axônio, e ainda aumenta a velocidade de condução dos impulsos

nervosos, sendo que o perfeito funcionamento das fibras nervosas depende da integridade da bainha de mielina (FREDERICKS, 1996). Fibras amielínicas também são envolvidas por células de Schwann mas não formam a bainha de mielina, encontram-se dispersas entre as demais fibras mielínicas e incluem fibras nervosas do sistema nervoso vegetativo e sensorial (FREDERICKS,1996). Apesar dessa diferença, ambas as fibras, mielinizadas e amielínicas, são cobertas por uma lâmina basal, que provê continuidade entre as células de Schwann no nódulo de Ranvier (IDE,1996).

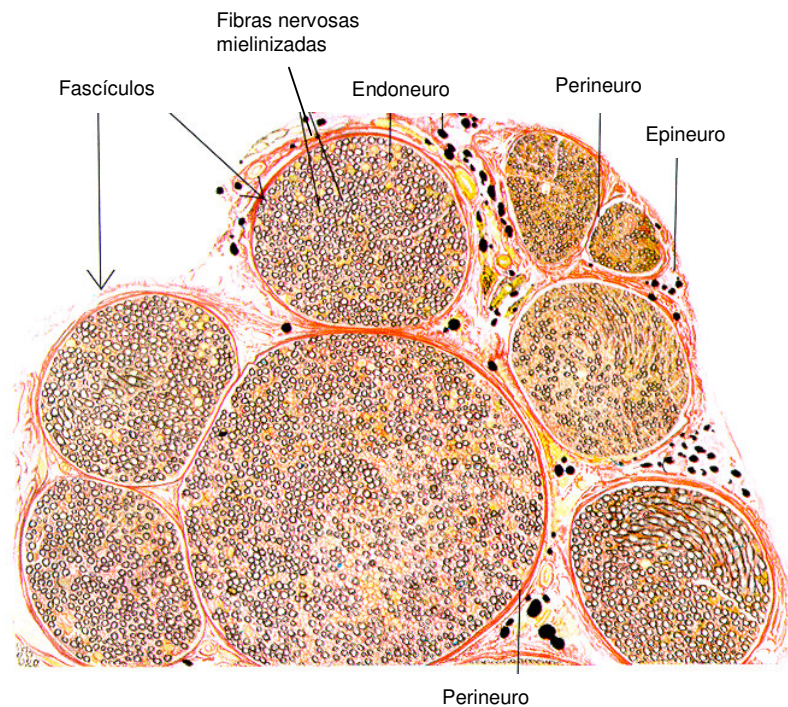


Figura 1: Corte transversal de um nervo periférico mostrando seus diferentes componentes. (Modificado de WILLIAMS, 1995)

As fibras nervosas dos nervos periféricos estão envolvidas por camadas de tecido conjuntivo, que além de dar sustentação, atuam protegendo essas fibras. Cada fibra destes fascículos está rodeada por fibras colágenas e fibrócitos que constituem o endoneuro, que provê suporte para as fibras e as

guia durante o processo de regeneração (FREDERICKS, 1996; DAHLIN, 2004). Grupos de fibras organizam-se em fascículos e são rodeados por uma camada de tecido conjuntivo fibroso, a qual é constituída de camadas alternadas de células poligonais achatadas (derivadas de fibroblastos). Tais células predominam na região mais interna do perineuro que possui junções estreitas (*tight junctions*) e fibras colágenas, chamada perineuro (PETERS *et al.*, 1991; WILLIAMS, 1995; DAHLIN, 2004). Esta bainha oferece uma força mecânica e serve como barreira à difusão perivascular. Ela ainda isola quimicamente os feixes de fibras, mantendo um ambiente fluido no interior dos fascículos, similar à proteção exercida pela barreira hemato-encefálica no SNC. O perineuro serve como uma barreira para macromoléculas, protegendo as fibras nervosas de várias substâncias danosas (FREDERICKS, 1996). Um nervo periférico é formado por um número diverso de fascículos, envoltos em tecido conjuntivo, o epineuro (DAHLIN, 2004), caracterizado por ser um pouco mais frouxo que o perineuro. Sua função é de proteção dos fascículos à traumas externos, sendo que mantém o suplemento de oxigênio através dos vasos epineurais ou *vasa nervorum* (Figura 2).

O suprimento sanguíneo de um nervo periférico é feito por um plexo capilar que penetra o perineuro e segue paralelamente com as fibras, conectando-se por vasos transversos, sendo que os nervos preiféricos têm dois sistemas vasculares independentes: (a) um sistema extrínseco de vasos nutritivos locais e vasos epineurais; (b) e um sistema intrínseco de microvasos que seguem longitudinalmente com o endoneuro (WILLIAMS, 1995).

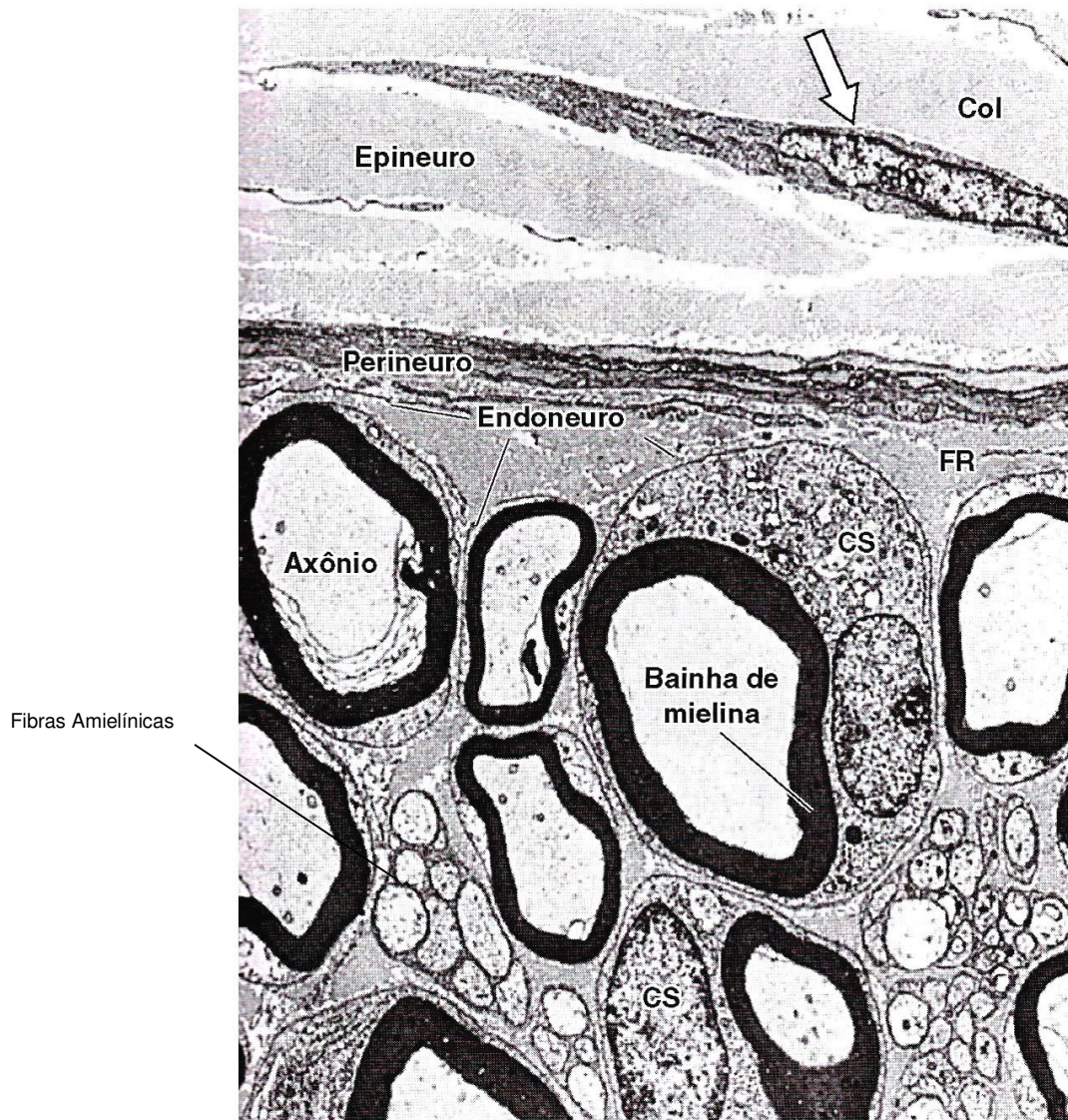


Figura 2: Micrografia eletrônica de corte transversal de nervo, mostrando o epineuro, o perineuro e o endoneuro. Fibras colágenas do epineuro (Col); fibroblastos do epineuro (Seta); fibras reticulares do endoneuro (FR); céls de Schwann (CS). (Modificado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004)

1.2 Lesão nos nervos periféricos

As funções motoras requerem um SNP intacto, uma vez que a ativação e coordenação normal do músculo esquelético dependem da integridade dos motoneurônios (α), e, também, dos neurônios aferentes que

conduzem informações sobre comprimento e a tensão muscular e a velocidade de estiramento do músculo para o SNC (FREDERICKS, 1996).

Diversas condições patológicas podem afetar os nervos periféricos, levando a deficiências sensório-motoras e alterações funcionais. A neuropatia periférica, um tipo de doença neuromuscular que, além de ser uma doença comum, indica alguma disfunção no SNP (ENGLAND; ASBURY, 2004). As principais lesões do SNP são aquelas que afetam primeiramente o axônio, ou seja, as axonopatias, que podem ser causadas por traumas agudos, por compressão, contusões traumáticas ou secção por objetos penetrantes, entre outros (COLOHAN *et al.*, 1996).

Em uma lesão de nervo periférico, não só os componentes periféricos são envolvidos, mas também componentes centrais, que incluem as alterações do corpo neuronal, após a lesão até a regeneração, chamadas cromatólise, e alterações na região da medula espinhal, além de alterações que ocorrem na região encefálica do SNC (LUNDBORG, 2003). A cromatólise inicia-se dentro das primeiras horas após a axotomia, ocorrendo um processo de vacuolação do citoplasma, aumento do volume nuclear, formação de múltiplos nucléolos e deslocamento do núcleo à periferia, isso tudo acompanhado por edema do soma neuronal (REIER, 1995; KARTJE; SCHWAB, 2006). Além disso, a dissolução dos grânulos de Nissl é uma das características mais marcantes da cromatólise, caracterizada pela reduzida coloração citoplasmática e granularidade quando secções de tecidos são coradas com corantes básicos. Ultraestruturalmente, é marcante a desagregação do aparelho de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso, com

um aumento concomitante na densidade de polirribossomos livres no citoplasma (PETERS *et al.*, 1991; REIER, 1995).

No axônio ocorre uma retração dos cotos distal e proximal do nervo, onde há extravasamento do axoplasma e colapamento da membranas plasmáticas lesadas, seguida de uma degeneração gradual do segmento distal (IDE, 1996; DAHLIN, 2004; JOHNSON *et al.*, 2005). As células de Schwann dividem-se e diferenciam-se distalmente à lesão e, junto com macrófagos, fagocitam restos de bainha de mielina, os quais perdem sua integridade durante a degeneração walleriana (JOHNSON *et al.*, 2005). As células de Schwann que perderam contato com o axônio proliferam, formando uma coluna chamada de banda de Büngner (Figura 3) dentro do tubo de lâmina basal (IDE, 1996; DAHLIN, 2004).

Arranjadas em colunas, as células de Schwann propiciam um tropismo mecânico, guiando os axônios em regeneração aos seus alvos. Elas são essenciais para a regeneração nervosa, uma vez que provêm um ambiente permissivo para o crescimento do axônio, sendo também fonte de fatores neurotróficos (IDE, 1996; JOHNSON, 2005; KARTJE; SCHWAB, 2006). Isto pode durar bastante tempo, enquanto não houver uma regeneração nervosa satisfatória. Muitos brotamentos emergem do segmento proximal do axônio e vão crescer na direção distal, dentro dos tubos endoneurais (Figura 3). Este processo exige contato e direcionamento entre a ponta do axônio e a superfície da célula de Schwann no tubo endoneural (JOHNSON, 2005). Axônios em regeneração no segmento distal crescem pela fixação da membrana do cone de crescimento à superfície interna da lâmina basal, ou sobre a membrana

plasmática das células de Schwann (IDE, 1996; DAHLIN, 2004; CHEN *et al.*, 2007).

A coluna de células de Schwann é uma fonte de fatores tróficos para a regeneração axonal. Em nervos normais intactos, os fatores tróficos são produzidos nos órgãos alvos e conduzidos ao corpo celular do neurônio por transporte retrógrado. Se a comunicação entre o axônio e o corpo celular é interrompida por alguma lesão, as células de Schwann produzem fatores neurotróficos, incluindo neurotrofinas como NGF (Fator de crescimento neural) e BDNF (Fator neurotrófico derivado do encéfalo), entre outros. Essas neurotrofinas liberadas são difusamente dispersas ao redor do axônio e promovem a sobrevivência neuronal estimulando o crescimento axonal, além de exercer uma função trófica na ausência da inervação dos órgãos-alvo (IDE, 1996; DAHLIN, 2004).

Os cones de crescimento axonal em regeneração também vão expressar moléculas de adesão em suas membranas, sendo que para ocorrer a fixação entre axônio e célula de Schwann, é necessária a presença de várias moléculas, entre elas a N-CAM (molécula neural de adesão celular), laminina 1 (L1), N-caderina e E-caderina, sendo a ligação axônio e lâmina basal mediada pela ligação laminina-integrina. Quando o contato entre o axônio e a célula de Schwann é re-estabelecido, a expressão de N-CAM e L1 é suprimida (IDE, 1996; DAHLIN, 2004). Além disso, expressam proteínas de membrana que são receptores para os fatores neurotróficos, tais como o receptor de baixa afinidade p75 e receptores tirosino-quinase A, B e C (TrKA, TrKB, TrKC, respectivamente), que vão possibilitar a ação trófica destes fatores (IDE, 1996; TERENGUI, 1999; DAHLIN, 2004, Figura 4).

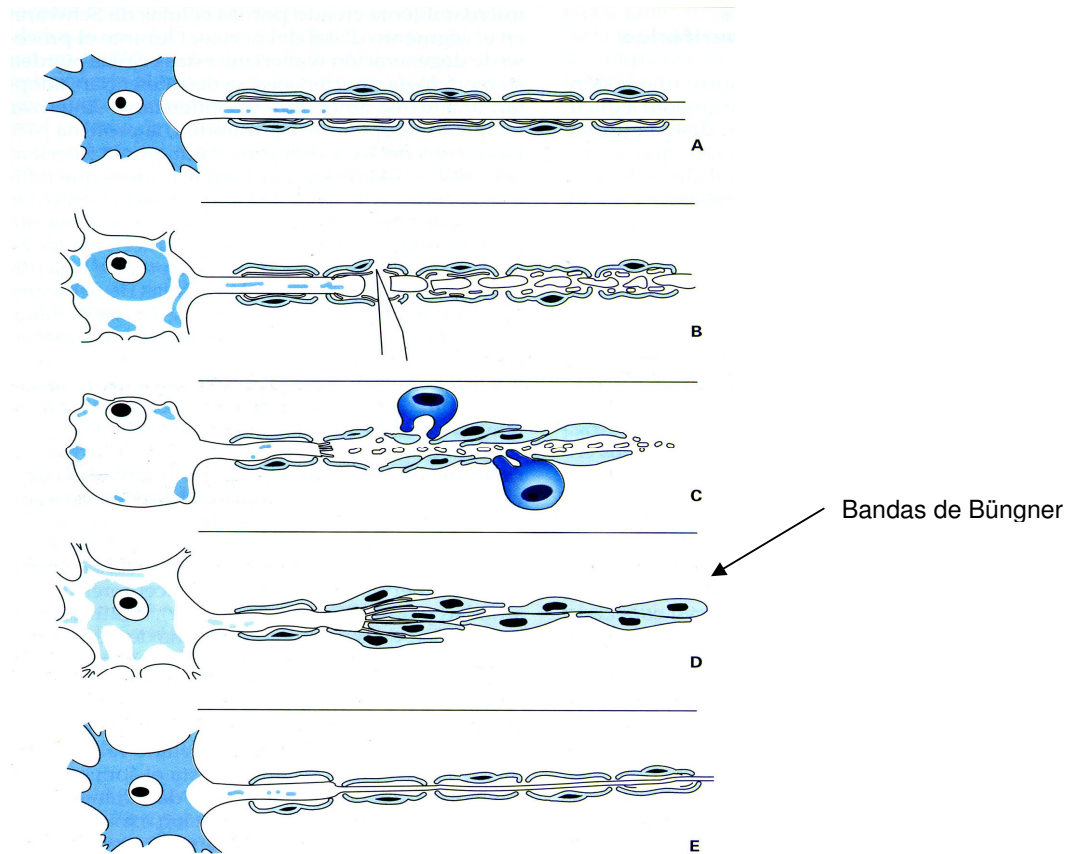


Figura 3: Ilustração da degeneração e regeneração de um axônio periférico. A= aparência normal da célula; B= lesão no nervo, inicia a degeneração da mielina e a cromatólise no soma; C= as células de Schwann se desdiferenciam e proliferam no segmento distal a lesão. Os macrófagos invadem este segmento e fagocitam os restos de mielina; D= as células de Schwann se orientam formando as bandas de Büngner, ao mesmo tempo que se observam os cones de crescimento regenerativo no segmento proximal, que progridem auxiliados pelas células de Schwann; E= os brotos regenerativos crescem e conectam-se ao alvo, e a cromatólise e a excentricidade do núcleo se corrigem. Os brotos que não se conectam com a periferia atrofiam e degeneram (adaptado de NIETO & VERDÚ, 1998).

Durante a regeneração, o contato entre o axônio e as células de Schwann vai estimular a remielinização dos axônios já regenerados, e, a partir daí, a transmissão eletroquímica entre o corpo celular e os órgãos efetores é refeita (IDE, 1996).

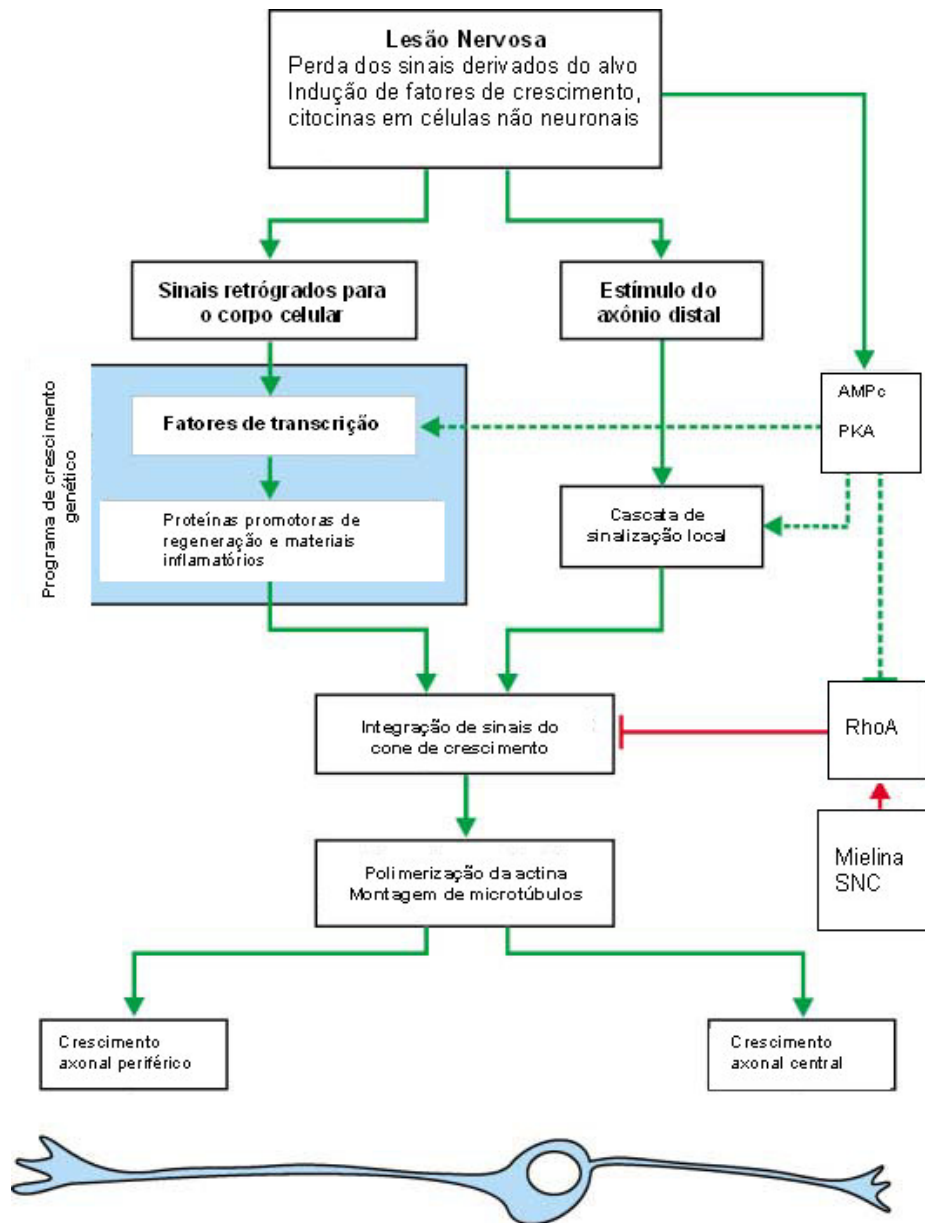


Figura 4: Esquema da sinalização na regeneração do SNP (Modificado de SNIDER *et al.*, 2002)

Sabe-se que a plasticidade neural permite um ajuste perante influências ambientais, estabelecendo ou restaurando conexões (ANNUNCIATO, 1994), sendo que a resposta contínua do sistema nervoso sobre informações internas e externas que recebe é fundamental para o controle do movimento, principalmente após uma lesão nervosa periférica

(LOWRIE, 1999). Tais ajustes são específicos e velozes, necessitando de uma adaptação no funcionamento dos tecidos nervoso e muscular, sendo muitas vezes essa plasticidade ampliada, visando uma melhor adaptação à função neuromuscular sobre as circunstâncias externas, como pode ocorrer no caso de uma lesão do nervo periférico (LOWRIE, 1999).

1.3 Exercício físico e lesão nervosa periférica

Os exercícios físicos são uma das abordagens dos tratamentos nas doenças neuromusculares. Além da recuperação funcional, existem ainda vantagens do uso de exercícios, como forma de prevenção de complicações, tais como contraturas musculares, atrofia que geram fraqueza muscular e manutenção do estado geral dos pacientes com patologias do SNP e do SNC (HERBISON *et al.*, 1983; WHITING; ZERNICKE, 2001).

Dentre as disfunções do SNP, lesões ciáticas ou síndromes do nervo ciático são muito comuns. Na prática fisioterapêutica utilizam-se exercícios físicos ou até equipamentos específicos visando uma melhor, maior e mais rápida recuperação dos pacientes. Para as lesões nervosas periféricas, vários métodos já foram empregados, como estimulação elétrica, ultra-som, laser de baixa frequência, exercícios físicos em esteira ou na água, ativos ou passivos, todos visando acelerar o processo regenerativo e um precoce retorno da funcionalidade do paciente (KISNER; COLBY, 1992; WHITING; ZERNICKE, 2001).

Já existem trabalhos onde foi comprovado o benefício do exercício físico em pacientes acometidos de doença neuromuscular. Porém,

estudos com humanos são de extrema dificuldade, visto que existem diferentes tipos de comprometimento, uma grande dificuldade em reunir um número adequado de pacientes para que a pesquisa se torne fidedigna, além da dificuldade em formar um grupo controle adequado pelas dificuldades éticas (LINDERMAN *et al.*, 1995; WRIGHT *et al.*, 1996).

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de responder qual seria o tratamento mais adequado nesses casos, porém, em pesquisas realizadas com modelos animais, visando uma maior compreensão dos efeitos do exercício físico sobre a lesão nervosa periférica, diferentes resultados foram encontrados (HERBISON *et al.*, 1983; LINDERMAN *et al.*, 1995; WRIGHT *et al.*, 1996). Estes diferentes resultados variam entre estimulação, retardo ou mesmo ausência de qualquer efeito sobre as estruturas nervosas analisadas (VAN MEETEREN *et al.*, 1997; HERBISON *et al.*, 1982).

Entre os estudos que demonstram o efeito benéfico do exercício físico na recuperação de uma lesão nervosa periférica, verificou-se que o treino de exercícios acentua o retorno da função sensório-motora na fase precoce da regeneração da lesão do nervo periférico e que os efeitos benéficos de 24 dias de exercícios depois do esmagamento, persistem até a fase final da regeneração (VAN MEETEREN *et al.*, 1997). De acordo com este estudo, quando a carga foi graduada em 35%, com a inclinação da esteira, em um treinamento físico em ratos, encontrou-se que o treinamento não causou nenhum dano aos músculos durante a reinervação após o esmagamento do nervo ciático, sendo o estímulo do programa de exercícios usado para aumentar as propriedades das fibras rápidas dos músculos sóleo e plantar de rato (HERBISON *et al.*, 1982). Em outro estudo, animais com lesão por

esmagamento no nervo ciático, submetidos a treinamento físico de endurance na esteira, obtiveram ganho funcional e aumento da regeneração quando comparados a animais que foram submetidos a treino de força ou treino concorrente envolvendo os dois treinamentos (ILHA *et al.*, 2008). O suporte do peso corporal também parece ser um importante fator na recuperação funcional. Ratos que sofreram compressão do nervo ciático e suportam seu próprio peso, apresentaram ganho na tensão tetânica muscular e na recuperação funcional em comparação com ratos que tiveram seus membros posteriores suspensos (MATSUURA *et al.*, 2001).

Ainda, ratos com lesão do nervo ciático que tiveram seu membro contralateral imobilizado, aumentando a atividade do lado lesado, apresentaram aumento do diâmetro médio das fibras nervosas mielinizadas quando comparados com os efeitos da imobilização do membro lesado (EISEN *et al.*, 1973). Outros estudos também mostraram que a prática da natação e de caminhada prolongada, durante o período de desnervação muscular, causado por lesão do nervo ciático em ratos, diminuiu a atrofia dos músculos desnervados, não impedindo o processo de reinervação (JAWEED *et al.*, 1974; IRINTCHEV *et al.*, 1991).

Confirmando a ação benéfica da natação sobre a lesão nervosa periférica, foi visto que durante a quarta semana de reinervação já não havia mais grande quantidade de debris de mielina e já existia remielinização nos axônios de ratos submetidos ao exercício físico na água após lesão do nervo ciático, quando comparados com aqueles que não realizaram exercícios (SARIKCIOGLU; OGUZ, 2001). Em outro estudo, a diferença entre as temperaturas da água demonstrou que ratos submetidos a 30 minutos de

natação em água fria tiveram seu estoque de glicogênio muscular quase todo depletado, enquanto que na água quente ocorreu apenas uma depleção parcial (BONINSEGNA *et al.*, 1990).

Por outro lado, existem estudos que mostraram que a natação não interfere na recuperação sensório-motora após a lesão do nervo ciático e que, um programa de caminhada não exaustivo em esteira, retarda a recuperação em ratos (VAN MEETEREN *et al.*, 1998). A comparação entre a natação na fase inicial da lesão (2 semanas pós-lesão) e na fase tardia (4 semanas pós-lesão), quando realizada por uma ou duas horas, mostrou que não houve diferença entre os tempos na fase inicial, porém, na fase tardia, a natação por duas horas foi prejudicial à reinervação muscular, efeito evidenciado pela diminuição do conteúdo protéico total muscular (HERBISON *et al.*, 1974). Além disso, foi observado que a atividade motora intensa (4horas de natação/dia), realizada diariamente através da natação, levou a deficiência na diferenciação das fibras nervosas em regeneração, em ratos submetidos ao esmagamento do nervo ciático (GUTMANN; JAKOUBEK, 1963).

Embora a maioria das respostas e adaptações ao exercício na água seja qualitativamente semelhante às resultantes do exercício em terra, existem diferenças quantitativas que podem afetar a prescrição de programas de atividades recreativas, terapêuticas e reabilitadoras. A força de flutuação, maior viscosidade e a condutividade térmica aumentada da água em comparação com o ar usualmente alteram o dispêndio energético aeróbico durante o exercício submáximo na água, de modo que pode ser maior, igual, ou menor do que na atividade em terra (RUOTI *et al.*, 2000). Os efeitos combinados da densidade da água e pressão hidrostática criam uma

compressão significativa sobre todos os tecidos do organismo na imersão (RUOTI *et al.*, 2000), sendo que a viscosidade, que é o atrito interno entre as moléculas, encontra-se aumentada, e é de suma importância para o início da reeducação muscular (SKINNER ; THOMSOM, 1985).

Durante o período de imersão os efeitos fisiológicos são basicamente uma elevação geral na temperatura corporal (RUOTI *et al.*, 2000; ROCHA, 1994). O corpo ganha calor através das áreas que estão debaixo d'água, porém só consegue perdê-lo a partir da vasodilatação dos vasos cutâneos e da secreção das glândulas sudoríparas das regiões que se encontram fora da água. O corpo ganha calor da água a partir da conversão de energia durante o exercício. Portanto, uma elevação da temperatura corporal é inevitável. À medida que a pele se torna aquecida, os vasos sanguíneos superficiais dilatam-se e o suprimento sanguíneo periférico é aumentado, ao mesmo tempo ocorrendo um aumento da frequência cardíaca por essa elevação da temperatura. O calor relativamente fraco da água reduz a sensibilidade das terminações nervosas sensitivas e, assim, o calor da água ajuda a aliviar a dor além da redução do espasmo muscular (SKINNER; THOMSOM, 1985; ROCHA, 1994; RUOTI *et al.*, 2000).

O escasso retorno funcional depois do reparo do nervo periférico em humanos tem motivado uma grande quantidade de estudos em modelos experimentais, o que tem colaborado para um maior entendimento dos eventos moleculares e celulares em torno da regeneração nervosa (MACKINNON *et al.*, 1985).

Além dos pontos positivos e negativos encontrados nos resultados das pesquisas comentadas anteriormente, o que leva à necessidade de novas pesquisas que confirmem alguns resultados, existe também a necessidade de determinar o tempo de atividade física a ser realizada. Estudos já determinaram a intensidade ideal do exercício físico, quando ele pode ser considerado anaeróbico ou passar a aeróbico, porém não se sabe qual intensidade de treinamento físico é benéfica na regeneração nervosa axonal (GOBATTO *et al.*, 2001; VOLTARELLI *et al.*, 2002). Além disso, é sabido que o uso da natação para ratos é um modelo de exercícios que apresenta vantagens sobre a esteira, pois a natação é uma habilidade natural do rato, o que evita a seleção de animais, necessária para o protocolo experimental com o uso de esteira de corrida (GOBATTO *et al.*, 2001).

Por estes motivos, este trabalho visa estudar os efeitos de exercícios físicos dentro da água aquecida sobre os processos regenerativos em uma lesão nervosa periférica por esmagamento. Busca-se ainda, com base nesse resultados, a viabilização da prescrição adequada de um programa de treinamento físico para melhor recuperação funcional e neural de animais submetidos à lesão do nervo ciático.

2-OBJETIVOS

2.1-Objetivo Geral

Estudar os efeitos do treinamento físico na água aquecida (31 °C) sobre a regeneração nervosa periférica em ratos machos adultos após lesão traumática experimental do nervo ciático direito.

2.2-Objetivos Específicos

- Analisar a recuperação da locomoção durante o período de treinamento utilizando o Índice de Funcionalidade do Ciático (VAREJÃO *et al.*, 2001)

- Avaliar a reinervação muscular pela atividade da enzima acetilcolinesterase específica no músculo gastrocnêmio direito utilizando o método espectrofotométrico de Ellman e colaboradores (1961)

- Avaliar a regeneração do nervo ciático, utilizando análises histológica e morfométrica da densidade de fibras mielínicas; estimativa da área média das fibras mielínicas; espessura média da bainha de mielina;

diâmetro do axônio e diâmetro da fibra; além da estimativa entre diâmetro da fibra e diâmetro do axônio (razão g) na porção distal à lesão, após cinco semanas de treinamento físico na água aquecida, em ratos machos adultos com compressão do nervo ciático direito (DE MEDINACELI, 1995; ILHA *et al.*, 2008).

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Modelo Animal

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos, adultos, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com variação de peso entre 250-380 g, mantidos em caixas moradia com água e ração “*ad libitum*”, permanecendo em ciclo claro/escuro de 12 horas cada. Os animais foram tratados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e conforme Lei nº6638 de 08/05/1979 do Brasil, que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica.

3.2-Tratamento da Amostra

Os animais foram randomicamente divididos em três (3) grupos.

Grupo 1- N=8 Nado Livre (NL), onde os animais sofreram cirurgia de esmagamento do nervo ciático e foram submetidos ao treinamento de natação;

Grupo 2- N=8 Sedentário (SED), onde os animais sofreram cirurgia de esmagamento do nervo ciático e não foram submetidos a treinamento físico;

Grupo 3- N=8 Controle (CON), onde os animais não sofreram intervenção cirúrgica e nem treinamento físico.

3.3-Procedimento Cirúrgico

Os animais dos grupos 1 e 2 foram pesados e posteriormente anestesiados com ketamina e xilasina (90/15 mg/kg respectivamente; ip.; Vetbrands, Brasil). Em seguida, foi realizada uma tricotomia e a assepsia da região glútea direita com álcool iodado. Por meio de uma incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm no integumento (Figura 5A), os músculos do quadril foram expostos e afastados para a identificação do nervo ciático direito (Figura 5B). Após a localização do nervo, o mesmo foi pinçado (Figura 5C) e comprimido em sua emergência, logo após o limite inferior do músculo glúteo máximo, através de uma pinça hemostática com 1 mm de espessura, por 30 segundos (Figura 5D; BRIDGE *et al.*, 1994).

A descontinuidade das fibras nervosas foi comprovada pela aparência transparente do segmento do nervo e a integridade do epineuro constatada pela continuidade do mesmo, sendo em seguida realizada a sutura da pele. Após o procedimento cirúrgico, o animal foi colocado em uma nova caixa para repouso e recuperação.

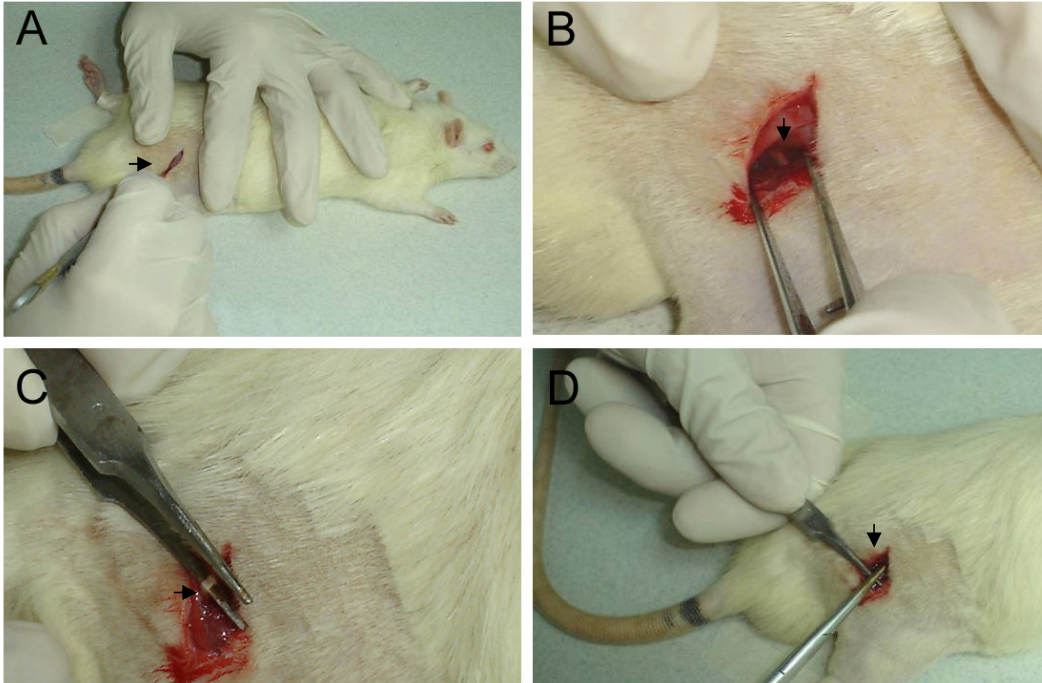


Figura 5: Imagens digitalizadas do procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo ciático direito. As setas mostram: em A, incisão longitudinal da pele; B afastamento da musculatura glútea e visualização do nervo ciático; C, pinçamento do nervo ciático direito; e D, esmagamento do nervo ciático direito com auxílio de uma pinça hemostática.

3.4-Tanque de Água

Os animais foram treinados em tanques de vidro, medindo 100 x 60 x 20 cm, com 80 L de água (Figura 6). A água foi mantida aquecida a 31 °C (\pm 1°C) através de aquecedores acoplados a um termostato (*RESUN RH9000* -150W, Brasil).

Aquecedor
acoplado ao
termostato

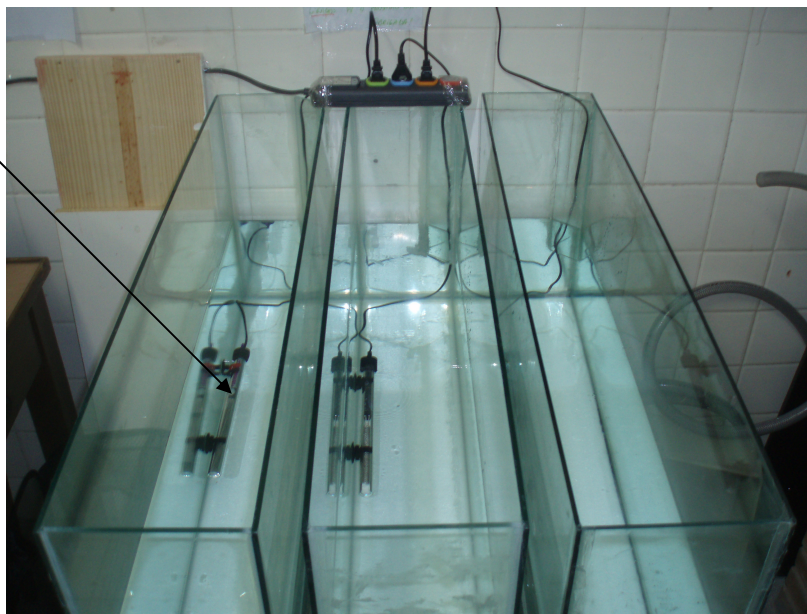


Figura 6: Tanques para natação, com água aquecida à 31°C através de um aquecedor acoplado a um termostato.

3.5-Treinamento

Uma semana após a intervenção cirúrgica, todos os ratos foram submetidos à adaptação ao local de treinamento, onde permaneceram por cinco minutos na água aquecida a 31°C, individualmente. Logo depois de retirados da água, foram secos e recolocados nas caixas moradias.

Após uma semana de adaptação iniciou-se o treinamento da seguinte maneira:

O grupo NL iniciou a primeira semana de treinamento, nadando 10 minutos, chegando ao final da semana com 25 minutos; na segunda semana iniciou com 25 minutos de nado e finalizou a semana com 35 minutos; na terceira semana iniciou com 35 minutos e finalizou com 45 minutos; na quarta semana iniciou com 45 minutos de treino e finalizou com um tempo total

de 60 minutos, permanecendo neste volume durante a quinta semana de treinamento (Figuras 7 e 8).

O grupo SED e o grupo CON não foram submetidos a nenhum tipo de treinamento.

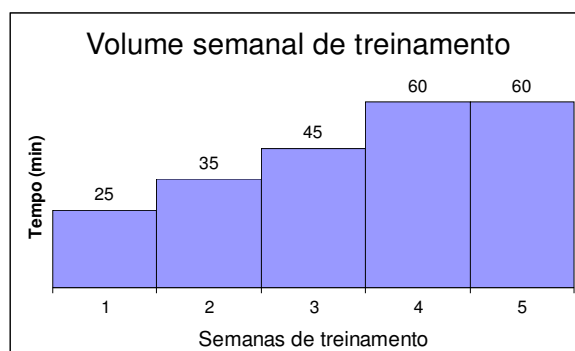


Figura 7: Gráfico da progressão do treino ao longo das semanas de treinamento do estudo

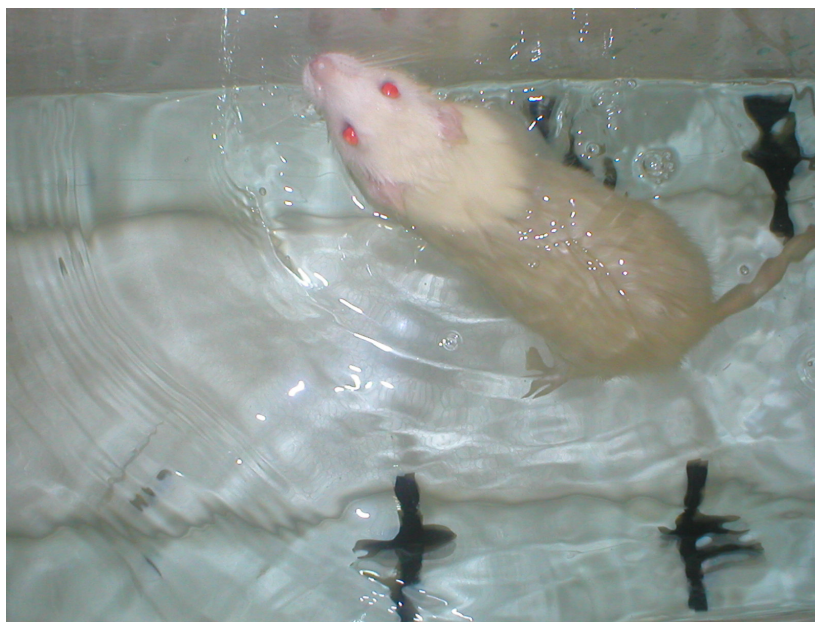


Figura 8: Rato nadando durante o treinamento.

3.6-Índice de Funcionalidade do Ciático (IFC)

Os animais foram submetidos a avaliações funcionais durante todo o período de treinamento. As avaliações iniciaram-se um dia antes do primeiro treinamento, o que correspondeu a duas semanas após o procedimento cirúrgico. As avaliações foram realizadas diariamente na primeira semana de treino e semanalmente nas semanas seguintes, sendo que a última avaliação foi realizada 48 horas após o último treino (Figura 9).

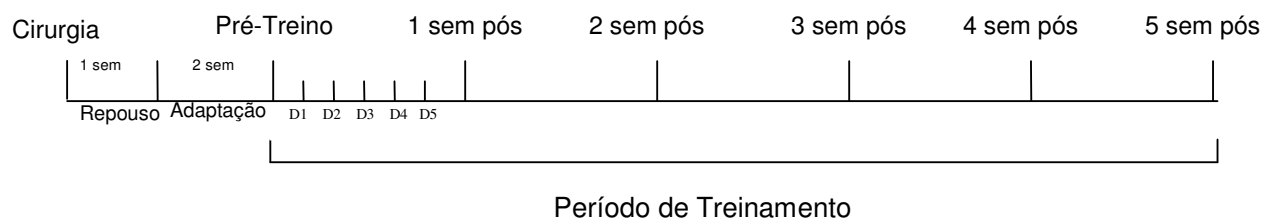


Figura 9: Esquema temporal das avaliações do IFC. D1=1º dia de treino; D2= 2º dia de treino; D3= 3º dia de treino; D4= 4º dia de treino; e D5= 5º dia de treino.

Para verificação do índice de funcionalidade do ciático, os animais foram treinados a atravessar uma pista (100 cm X 8,5 cm) em direção a um esconderijo escuro (Figura 10). Durante as avaliações, a região plantar dos membros posteriores foi molhada em uma almofada de carimbo com tinta e o animal foi colocado para atravessar a pista coberta com um papel branco. Durante a travessia, marcas da região plantar dos membros posteriores foram impressas sobre o papel (Figura 11), e estas foram utilizadas para a determinação do IFC (VAREJÃO *et al.*, 2001) pela seguinte fórmula:

$$SFI = -38.3(EPL - NPL)/NPL + 109.5(ETS - NTS)/NTS + 13.3(EIT - NIT)/NIT - 8.8$$



Figura 10: Pista para marcação da região plantar dos membros posteriores dos ratos, coberta com papel .



Figura 11: Após a caminhada na pista, ficam marcados no papel a região plantar dos membros posteriores.

A mensuração do índice da condição funcional do ciático utilizando o modelo da caminhada foi inicialmente proposto por De Medinaceli (1982), sendo modificado por Bain (1989) e amplamente utilizado em diversos estudos posteriores (TUMA et al., 1999; VAN MEETEREN et al., 1997a; VAN MEETEREN et al., 1998; VAREJÃO et al., 2001). Onde:

EPL (*experimental print length*) corresponde ao comprimento da marca no lado experimental (com lesão do ciático);

NPL (*normal print length*) corresponde ao comprimento da marca no lado normal (sem lesão do ciático);

ETS (*experimental total spreading*) corresponde à distância linear do centro da marca do primeiro dedo ao centro da marca do quinto dedo no lado experimental;

NTS (*normal total spreading*) corresponde à distância linear do centro da marca do primeiro dedo ao centro da marca do quinto dedo no lado normal;

EIT (*experimental intermediary toe*) corresponde à distância linear entre os centros do segundo e quarto dedos no lado experimental;

NIT (*normal intermediary toe*) corresponde à distância linear entre os centros do segundo e quarto dedos no lado normal (Figura 12).

As medidas foram realizadas com auxílio de um paquímetro, e a unidade utilizada em todas as medidas descritas acima foi o milímetro. Os resultados obtidos pela fórmula significaram o percentual do déficit do lado lesado, comparado ao lado não lesado. Um índice de próximo a 0 (± 11)

representa a função normal, enquanto um índice próximo a -100 significa a perda completa da função (DE MEDINACELI *et al.*, 1982).

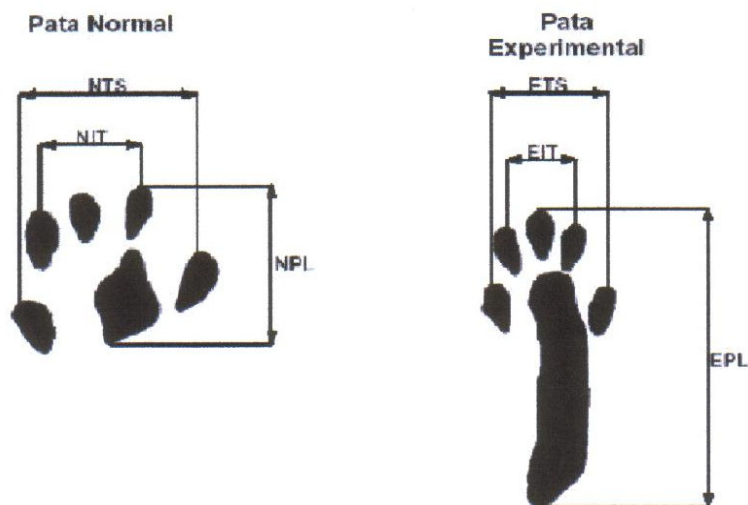


Figura 12: Exemplo da marca da região plantar controle e da região plantar experimental, onde são adquiridas medidas referentes ao comprimento da pata, distância entre os dedos, onde NTS=distância linear do centro da marca do primeiro dedo ao centro da marca do quinto dedo no lado normal; NIT=distância linear entre o centro do segundo e do quarto dedo no lado normal; NPL=comprimento total da marca do lado normal; ETS=distância linear do centro da marca do primeiro dedo ao centro da marca do quinto dedo no lado experimental; EIT=distância linear entre o centro do segundo e do quarto dedo no lado experimental; e EPL=comprimento total da marca do lado experimental.

3.7-Coleta de Material para Análises Histológica e Bioquímica

Após as cinco semanas de treino, tanto os animais dos grupos experimentais, quanto os animais do grupo controle, foram pesados e anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, ip; Cristalia, Brasil), heparinizados com uma injeção intracardíaca de 1000 UI de heparina (Cristalia, Brasil), e perfundidos transcárdiacamente com auxílio de uma bomba peristáltica (Control Company, Brasil). Inicialmente foi realizada a lavagem da árvore vascular, utilizando-se 400 mL de solução salina 0,9%, sendo logo em seguida

retirado o músculo gastrocnêmio através de uma incisão na região dorsal do membro posterior direito. Os músculos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer (-70° C) para posterior análise bioquímica. Após, foi perfundido com 400 mL de solução fixadora composta de glutaraldeído 0,5% (Sigma, EUA) e paraformaldeído 4% (Synth, Brasil), em tampão fosfato (TF), 0,1M, pH 7,4.

Depois da perfusão foram retiradas as porções distais à lesão do nervo ciático direito, usando os mesmos parâmetros de localização para o grupo controle, sendo estes imersos em uma solução fixadora de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 1,5% diluídos em TF 0,1 M, pH 7,3, por 1 h a temperatura ambiente. A seguir, o material foi mantido a 4°C até o procedimento de inclusão em resina Durcupan.

3.7.1- Histologia e Morfometria do Nervo Ciático

A porção retirada do nervo ciático foi submetida ao seguinte protocolo (RODRIGO *et al.*, 1996):

- duas lavagens em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, por 15 min;
- duas lavagens em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, por 30 min;
- imersão em OsO₄ 1% (Sigma,EUA) por 1 h;
- desidratação em álcool: 2 vezes 5 min em álcool 50%
2 vezes 10 min em álcool 70%
2 vezes 20 min em álcool 96%
2 vezes 20 min em álcool 100%

-colocados em óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences, EUA) por 5 min;

-colocados em óxido de propileno mais Durcupan ACM (Fluka, Suíça) por 10 min;

-colocados em Durcupan ACM (Fluka, Suíça) submetidos por 24 h ao vácuo;

-incluídos em blocos de Durcupan ACM (Fluka, Suíça) e polimerizados em estufa a 60° C por 48 h.

Após, foram realizadas secções transversais semifinas (1 μm) em um ultramicrotomo (MT 6000-XL, RMC, Tucson, EUA) com navalhas de vidro e analisadas com microscópio óptico após a coloração em azul de toluidina 1%, diluído em tetraborato de sódio 1%. (MERCK, Alemanha).

Posteriormente, imagens de cortes das porções distais do nervo foram digitalizadas (inicialmente 1000x e depois ampliada 200x para análise), usando um microscópio Nikon Eclipse E-600 (Tóquio-Japão), acoplado a uma câmera de Alta Performance Pró-Séries CCD e o *Software Image Pro-Plus 4.1* (Media Cybernetics, Bethesda, MD). Para avaliação morfológica, dez imagens foram obtidas, randomicamente, de cada nervo, variando entre imagens da periferia do nervo e imagens centrais do nervo, para obtenção de uma área representativa por nervo (33.160 μm^2 ; de área analisada por segmento).

A mensuração foi realizada nas fibras mielínicas e incluíram: (1) densidade de fibras mielínicas (número de fibras/ mm^2); (2) área média das fibras (μm^2); (3) diâmetro do axônio (μm); (4) diâmetro da fibra mielinizada (μm); (5) espessura média da bainha de mielina (μm); e (6) razão *g* (estimativa

entre diâmetro da fibra e diâmetro do axônio; uma medida do grau de mielinização).

Fibras nervosas individuais foram contadas e a densidade de fibras mielínicas foi determinada pela proporção de fibras mielínicas/área total analisada. A espessura média da bainha de mielina foi estimada usando a ferramenta de medidas do *Software Image Pro Plus*. As medidas da área foram estimadas com a técnica de contagem de pontos (GUNDERSEN; JENSEN, 1987; HERMEL *et al.*, 2006; ILHA *et al.*, 2008), usando uma grade de densidade de pontos de 1 ponto por $1,56 \mu\text{m}^2$ e a seguinte equação:

$$\hat{A} = \Sigma p.a/p$$

Onde, \hat{A} é a área, Σp é a soma dos pontos, e a/p é o valor da área ponto ($1,56 \mu\text{m}^2$). Para estimar o diâmetro das fibras e do axônio, a área individual de cada fibra foi mensurada e o valor obtido foi convertido ao diâmetro de um círculo, obtendo-se, então, um número equivalente a área.

3.7.2 – Detecção Bioquímica da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase no Múculo Gastrocnêmio

O músculo gastrocnêmio direito foi removido logo após a lavagem do material para fixação com solução salina. Para determinar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), o material retirado foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2 contendo Triton X-100 1% (Sigma, EUA), centrifugado (Biorad 680, Brasil) a 1000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante utilizado como fonte de AChE total.

A atividade da enzima foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Ellman e colaboradores (1961). O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio 24 mM pH 7,2, ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, Sigma EUA) 10 mM, iso-OMPA 0,1 mM (inibidor específico de butirilcolinesterase, Sigma, EUA) e a fonte enzimática. Após 2 min de pré-incubação em temperatura ambiente, a reação foi iniciada pela adição do substrato iodeto de acetiltiocolina (Sigma, EUA) 0,8 mM e monitorada por 5 min (30-30 segundos) a 412 nm em espectrofotômetro (Hitachi CT 70 MX, Japão).

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry e colaboradores, (1951) e a atividade da AChE foi expressa como μmol de substrato hidrolisado por hora por mg de proteína.

3.8-Análise Estatística

O índice de funcionalidade do ciático foi analisado utilizando análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida pelo teste de *post-hoc de Fisher* LSD (n=8 animais por grupo). Para as medidas morfométricas (n=6 animais por grupo) e para a medida bioquímica da AChE (n=3 animais por grupo), uma ANOVA de uma via foi utilizada; seguidos pelo teste do *post-hoc de Fisher* LSD a significância foi considerada com $P < 0,05$ para ambos. Os dados foram analisados no SPSS® 11.5 (*Statistical Package for the Social Sciences*, Inc., Chicago, USA).

4- RESULTADOS

Observação do Comportamento dos Animais na Água

A análise comportamental foi realizada através da observação dos animais durante o período de exercício na água. Inicialmente, nas primeiras sessões de exercício, os animais do grupo NL, ao serem colocados na água, nadavam com bastante rapidez por alguns minutos e, pareciam procurar um local para escapar, porém, como não o encontravam, adotavam o comportamento de flutuação no canto do tanque. Este comportamento era inibido através de estímulos com toques no próprio animal. Com a progressão do exercício, os animais foram ficando menos agitados e também já não apresentavam o comportamento de flutuação seguidamente, sendo este por vezes ausente durante toda sessão de exercício.

Outro aspecto comportamental importante é que, inicialmente, os animais defecavam em grande quantidade, sendo que progressivamente esta quantidade foi diminuindo, e ao final do estudo já eram muito poucas. Porém, esta quantidade não foi quantificada e nem pesada.

Índice de Funcionalidade do Nervo Ciático

Para calcular o IFC, um total de 1980 marcas de patas foram analisadas, incluindo avaliação pré-treino, avaliações diárias durante a primeira semana de treinamento e da primeira à quinta semana pós-treino. As curvas do IFC são apresentadas na figura 13.

No grupo controle o IFC permaneceu estável, em torno de -10, considerado normal, durante todo o experimento. Na avaliação pré-treino, os valores do IFC para os grupos experimentais foram significativamente menores do que o grupo controle ($P < 0,001$). Este resultado indica perda de função motora no membro posterior direito, duas semanas após os grupos serem submetidos à cirurgia para o esmagamento do nervo ciático, o que confirma a efetividade da cirurgia. Este resultado se manteve durante a primeira semana de treinamento, não havendo diferença entre os grupos sedentário e nado livre.

Na segunda semana de treinamento, tanto o grupo sedentário quanto o grupo treinado, já não apresentavam diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle, por mais que ainda permanecessem abaixo do índice de normalidade ($P > 0,05$).

Na terceira e na quarta semana de treinamento o grupo que realizou natação não apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo controle ($P > 0,05$), enquanto o grupo sedentário diferiu estatisticamente do grupo controle ($P = 0,05$; $P = 0,01$, respectivamente), porém, não do grupo treinado ($P > 0,05$).

Ao final do período de treinamento, ou seja, na quinta semana de treino, os grupos experimentais se igualaram ao grupo controle, não diferindo

mais estatisticamente, permanecendo dentro dos valores de normalidade para o índice de funcionalidade do ciático.

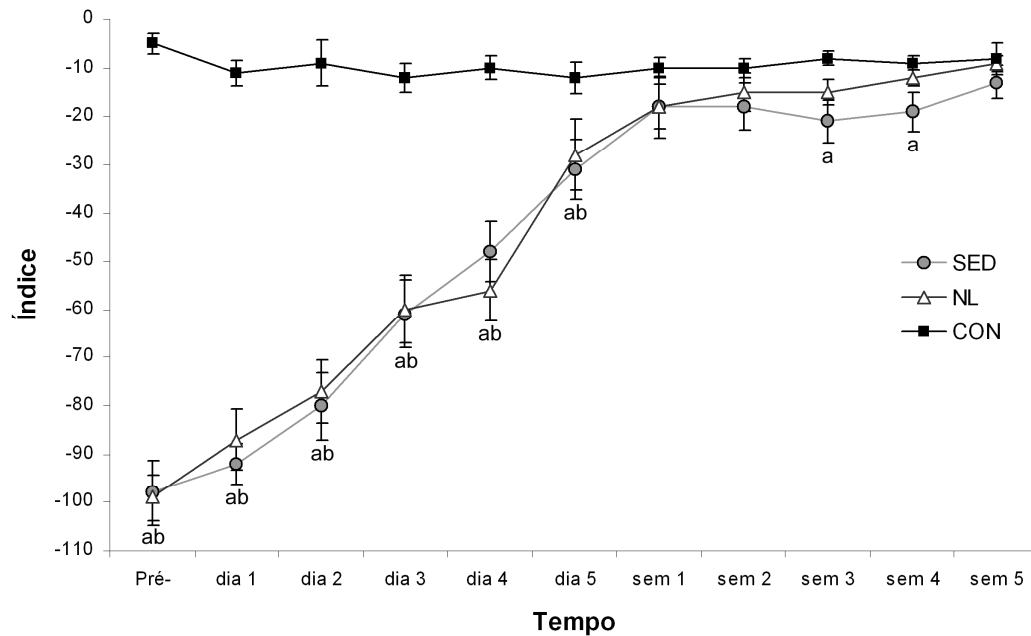


Figura 13: Comparação da recuperação funcional determinada pela Índice de Funcionalidade do Ciático (IFC) antes do treinamento de natação, durante o período de treino e após o término do treinamento. O gráfico mostra a comparação entre os grupos CON, SED e NL. "a" = quando o grupo sedentário for diferente do controle; "b" = quando o grupo nado livre for diferente do controle. CON=Controle; SED= Sedentário; NL= Nado Livre.

Análise Histológica

As características histológicas do nervo ciático dos ratos do grupo controle apresentaram uma distribuição regular de fibras mielínicas de diferentes diâmetros, com tamanho de fibra e espessura da bainha de mielina proporcionais, como mostra a figura 14. Pode-se observar ainda, fibras amielínicas e a presença de fibroblastos.

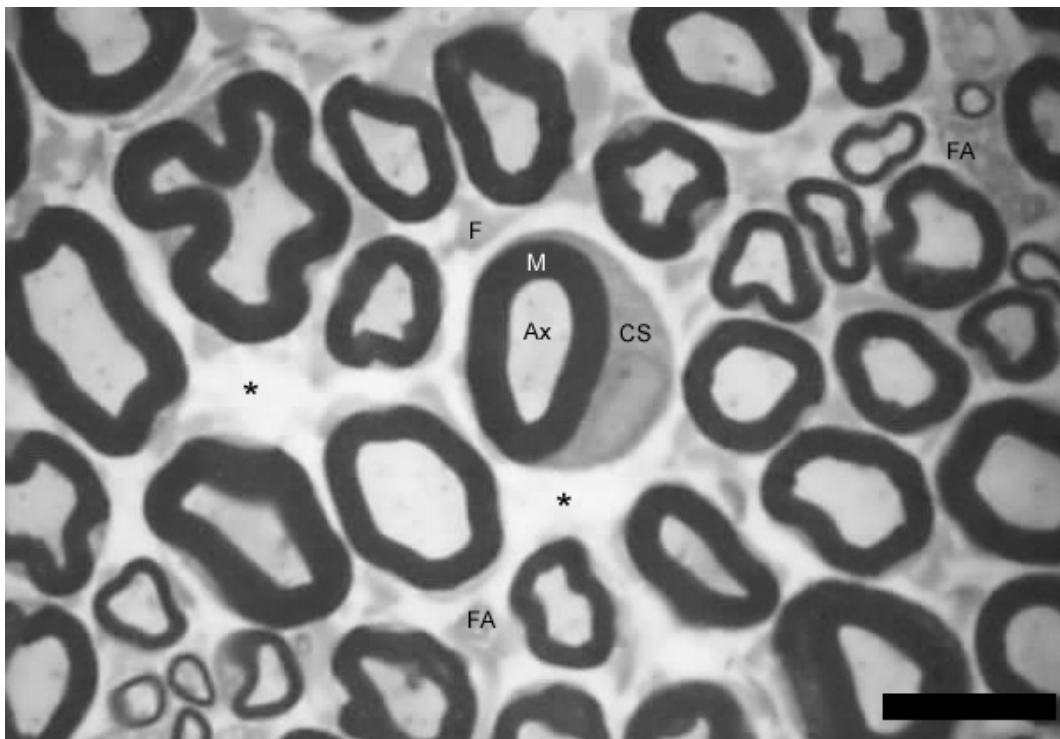


Figura 14: Imagem digitalizada de um corte transversal do nervo ciático de rato do grupo controle. Observar: Ax= axônio; CS= célula de Schwann; F= fibroblasto; FA= fibras amielínicas; M= bainha de mielina; * (asterisco)= espaço entre as fibras nervosas. Barra= 10 μ m.

No grupo sedentário, que sofreu cirurgia para esmagamento do nervo ciático mas não realizou exercício, as características histológicas foram diferentes do grupo controle. Observou-se uma diminuição no tamanho das fibras mielínicas, um aumento do tecido conjuntivo entre as fibras nervosas, pois existe um afastamento entre as fibras que gerou este aumento. Houve também alteração no formato das fibras nervosas e fragmentos de bainha de mielina no espaço intersticial, que indicam a permanência de processo degenerativo, além da presença de macrófagos, que estão carregados de vacúolos (Figura 15).

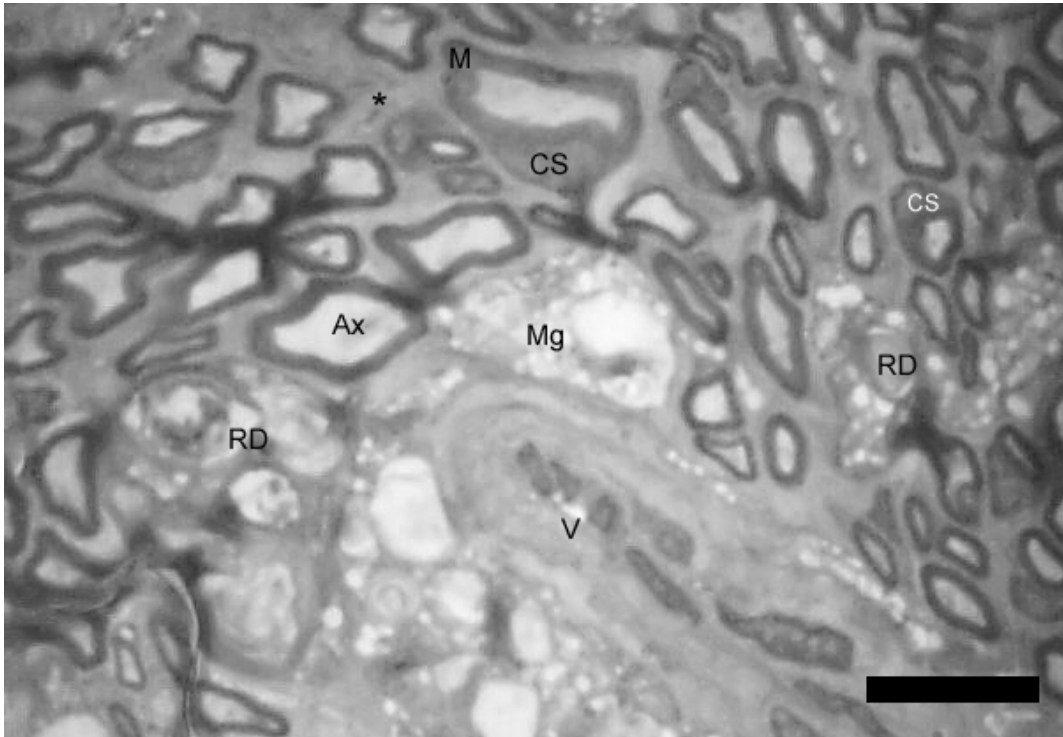


Figura 15: Imagem digitalizada de um corte transversal do nervo ciático de rato do grupo sedentário. Observar: Ax= axônio; CS= célula de Schwann; M= mielina; RD= restos de degeneração; Mg= macrófagos; V= vaso sanguíneo; * (asterisco)= espaço entre as fibras nervosas ocupado por tecido conjuntivo. Barra= 10 μ m.

No grupo nado livre, onde os ratos foram submetidos a cirurgia para esmagamento do nervo ciático e treinamento de natação, apresentaram persistência de fibras em degeneração, algumas com uma aparência gigante, sendo que existe uma predominância de fibras mielinizadas pequenas. Além disso, o aumento do tecido conjuntivo entre as fibras nervosas permanece, levando a um aumento do espaço. Existe alteração no formato das fibras e fragmentos de bainha de mielina soltos no espaço intersticial. Porém, quando se comparam diferentes imagens de cortes entre os grupos sedentário e nado livre, percebe-se que as fibras nervosas do grupo nado livre são de menor tamanho, porém em uma fase de remielinização mais avançada, sendo que, os

macrófagos carregados de vacúolos, aparentes no grupo controle não são vistos no grupo treinado (Figura 16).

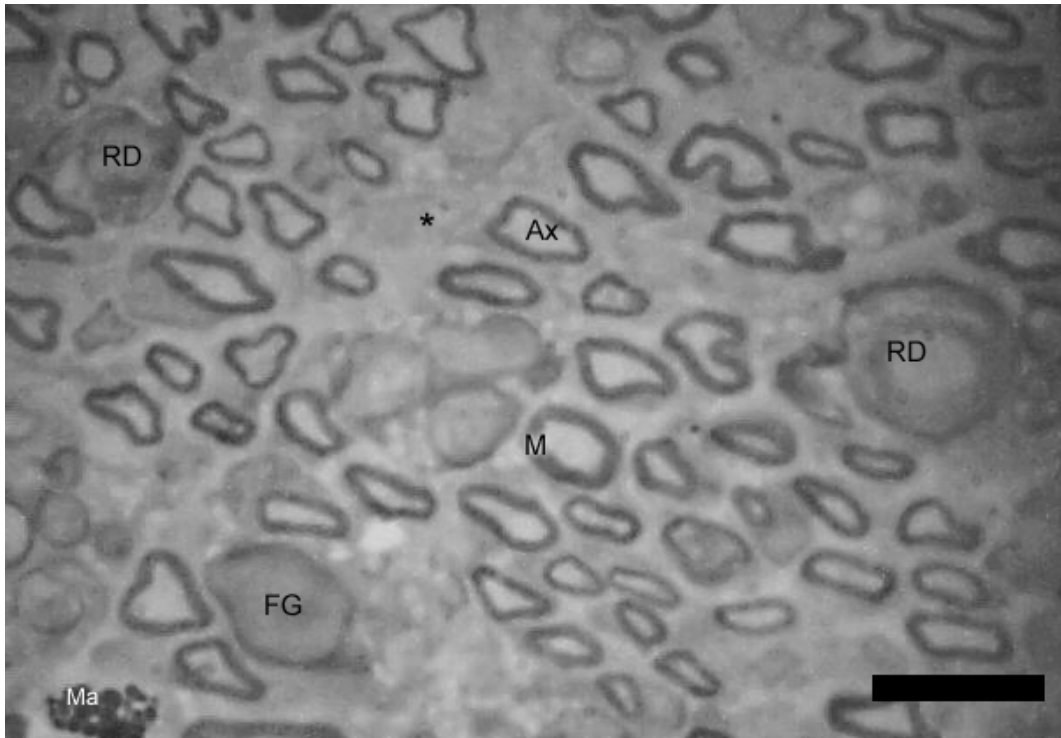


Figura 16: Imagem digitalizada de um corte transversal do nervo ciático de rato do grupo nado livre. Notar: Ax= axônio; FG= fibra gigante; M=mielina; Ma= mastócitos; RD= restos de degeneração; * (asterisco)= espaço endoneurial. Barra= 10 μ m.

Análise Morfométrica

A análise morfométrica da porção distal do nervo ciático direito dos grupos experimentais, nado livre e sedentário, mostraram uma tendência à um aumento na densidade de fibras nervosas do nervo, quando comparados com o grupo controle, porém não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,139$; $P = 0,08$, respectivamente; Figura 17).

Em relação a espessura da bainha de mielina, os grupos NL e SED foram diferentes estatisticamente do grupo controle ($P < 0,001$), porém entre os dois grupos experimentais não houve diferença; as fibras apresentaram semelhante espessura da bainha de mielina (Figura 18).

Quando analisada a média da áreas das fibras nervosas, o resultado foi semelhante, sendo os grupos experimentais diferentes estatisticamente do grupo controle e não diferindo entre si ($P < 0,001$; Figura 19).

Tanto o diâmetro das fibras nervosas (Figura 20), quanto o diâmetro dos axônios (Figura 21), apresentaram diferença significativa dos grupos experimentais em comparação com o grupo controle ($P < 0,001$). Este resultado também se repetiu na análise do g ratio onde os grupos experimentais apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle ($P < 0,001$; Figura 22).

Densidade de fibras mielínicas

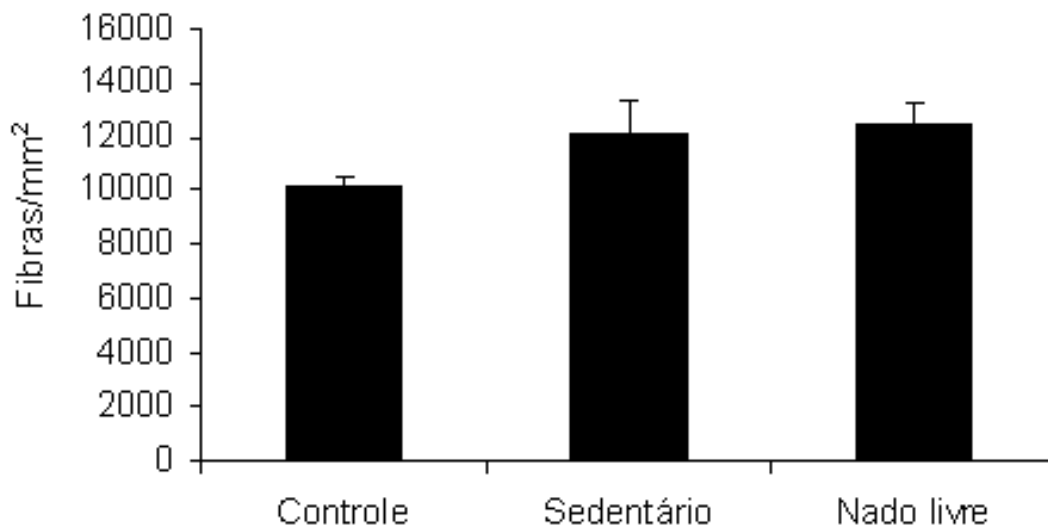


Figura 17: Gráfico de resultados da medida da densidade das fibras mielínicas do nervo ciático direito. Não houve diferença entre os grupos experimentais e o grupo controle ($P > 0,05$).

Espessura da bainha de mielina

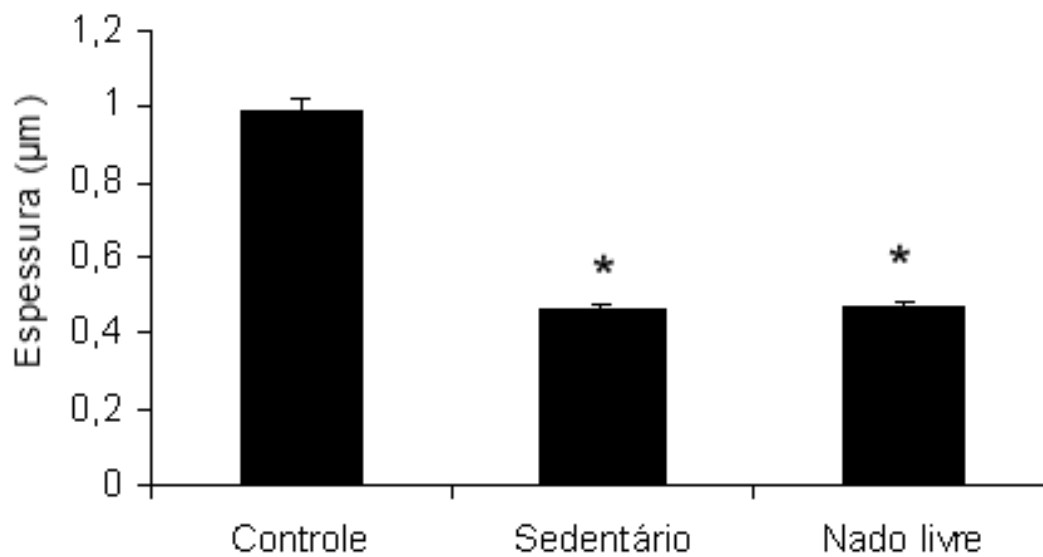


Figura 18: Gráfico de resultados da medida da espessura da bainha de mielina das fibras nervosas do nervo ciático direito. * (asterisco) = quando grupos sedentário e nado livre forem diferentes do controle ($P < 0,05$).

Área média das fibras mielínicas

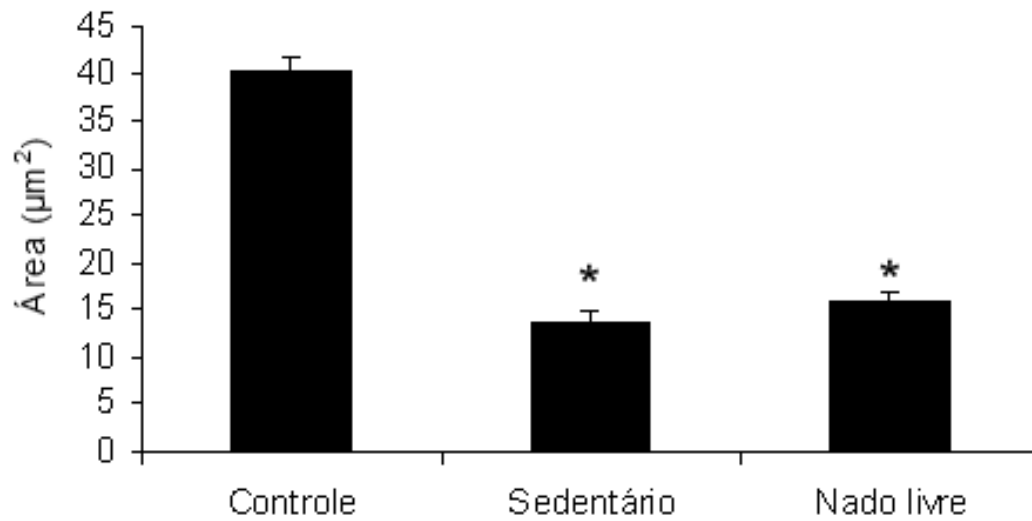


Figura 19: Gráfico de resultados da medida da área média das fibras mielínicas. * (asterisco) = quando os grupos sedentário e nado livre forem diferentes do controle ($P < 0,05$).

Diâmetro médio das fibras mielínicas

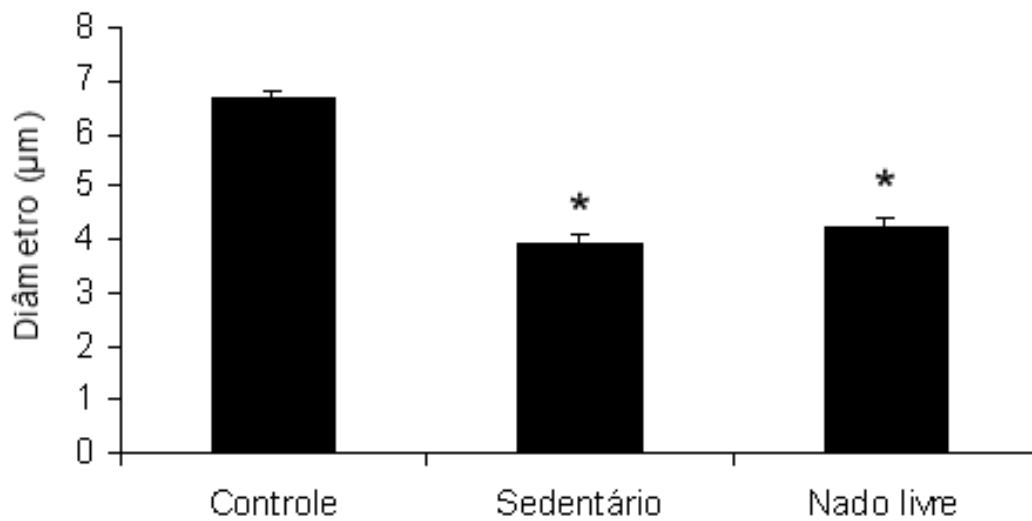


Figura 20: Gráfico de resultados da medida do diâmetro médio das fibras mielínicas do nervo ciático direito. * (asterisco) = quando os grupos sedentário e nado livre forem diferentes do controle ($P < 0,05$).

Diâmetro médio dos axônios

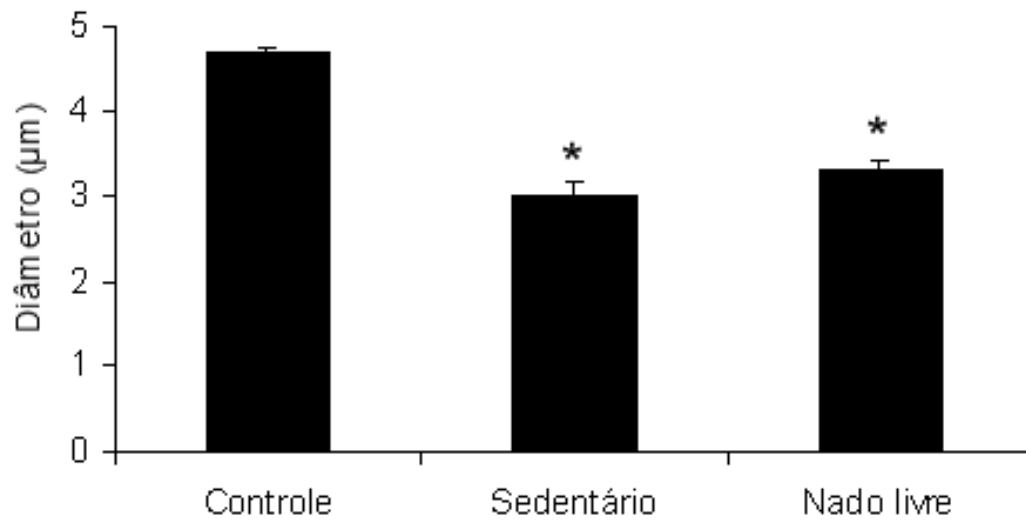


Figura 21: Gráfico de resultados da medida do diâmetro médio dos axônios do nervo ciático direito. * (asterisco) = quando os grupos sedentário e nado livre forem diferentes do controle ($P < 0,05$).

Razão g

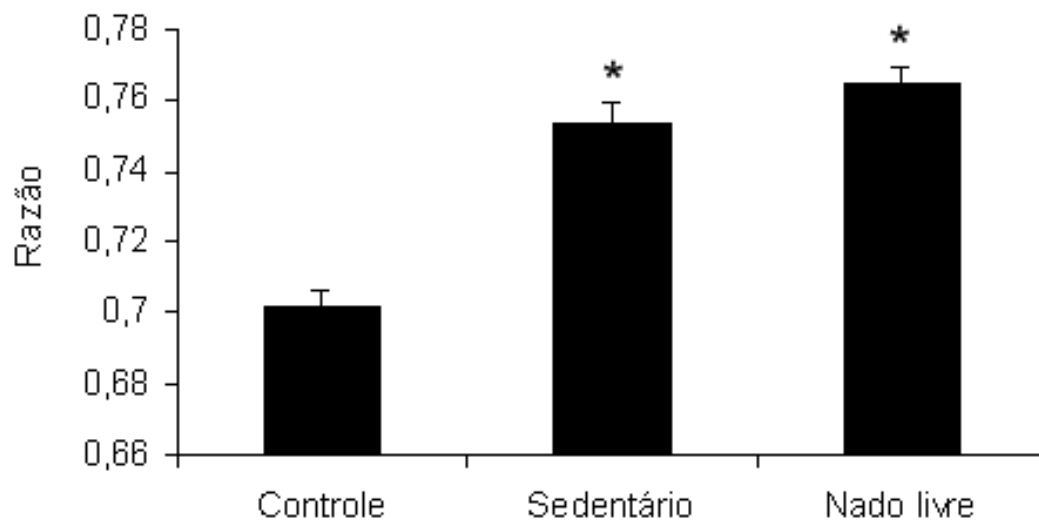


Figura 22: Gráfico de medida do grau de mielinização, uma estimativa entre o diâmetro da fibra e o diâmetro do axônio. * (asterisco) = quando os grupos sedentário e nado livre forem diferentes do grupo controle ($P < 0,05$).

Atividade Acetilcolinesterase

As medidas da atividade da enzima AChE não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($P > 0,05$), porém os dois foram diferentes do grupo controle ($P < 0,05$). Pode-se notar uma tendência existente no grupo treinado em apresentar maior atividade da AChE no músculo gastrocnêmio direito do que o grupo sedentário mas, essa diferença não é estatisticamente significativa ($P > 0,05$; Figura 23).

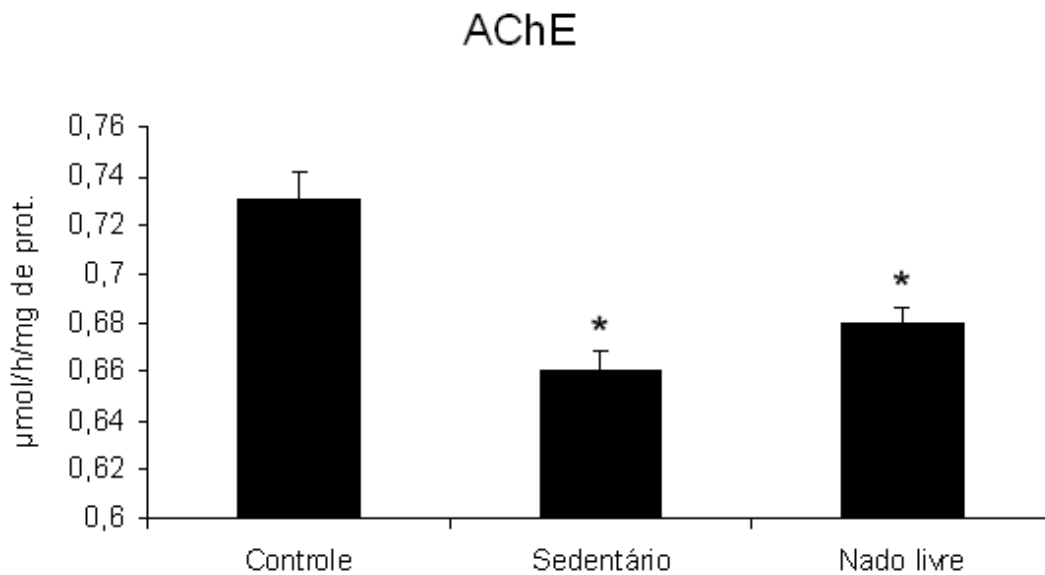


Figura 23 :Atividade da AChE no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos ou não a natação. * (asterisco) = quando sedentário e treinado são diferentes do controle ($P < 0,05$).

5-DISCUSSÃO

Em busca de novas estratégias, que acelerem a regeneração nervosa e a recuperação funcional após uma lesão de nervo periférico, diferentes estudos têm utilizado o nervo ciático como modelo experimental de lesão nervosa periférica (EISEN *et al.*, 1973 ;JAWEED *et al.*, 1974; JAWEED *et al.*, 1982; VAN MEETEREM *et al.*,1998; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; ILHA *et al.*, 2008). Sabe-se que o nervo ciático de ratos possui um tronco nervoso adequado e de fácil manipulação cirúrgica (RODRIGUEZ *et al.*, 2004), além de demonstrar detalhes celulares, que são indistinguíveis do nervo periférico humano (Mackinnon *et al.*, 1985). Além do mais, a lesão experimental do nervo ciático provoca alterações motoras semelhantes àquelas encontradas nas neuropatias periféricas (DE MEDINACELI *et al.*, 1982; 1985; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; ILHA *et al.* 2008).

Diversos estudos experimentais tentam estimular a regeneração do nervo ciático e promover a reinervação dos órgãos-alvo, para isso utilizam técnicas que se aproximam da prática fisioterapêutica utilizada no tratamento humano (JAWEED *et al.*, 1974; VAN MEETERM *et al.*, 1997b; MATSUURA *et al.*, 2001; MENDONÇA *et al.*, 2003; GIGO-BENATO *et al.*, 2004; RASO *et al.*,2005). O presente estudo utilizou um modelo de esmagamento do nervo ciático de ratos para investigar a hipótese de que o treinamento físico na água

aquecida atue positivamente sobre a recuperação funcional e alterações morfológicas na regeneração nervosa periférica.

Nossos resultados mostraram que os grupos experimentais (treinados e sedentários) recuperaram a função motora após uma semana de treinamento, sendo que, após quatro semanas de treino, atingiram o índice de normalidade, quando submetidos a avaliação pelo IFC, não tendo a natação interferido. Por outro lado, a natação não acelerou o processo de regeneração nervosa, nem o retardou. Outro estudo em nosso laboratório, onde ratos foram submetidos à mesma técnica cirúrgica de esmagamento do nervo ciático e a um treinamento em esteira, ou de força, ou ambos, os animais dos grupos experimentais e sedentário também tiveram recuperação da função motora após a primeira semana de treinamento e alcançaram o índice de normalidade em quatro semanas de treinamento (ILHA *et al*, 2008).

Já foi visto que a natação pré- ou pós-esmagamento do nervo ciático, iniciada 24 horas após a lesão, não altera o índice de funcionalidade do ciático, e que 21 dias após a lesão do nervo ciático os ratos recuperam a função motora (VAN MEETEREM *et al.*, 1998), estando estes resultados parcialmente de acordo com os nossos achados. No entanto, em nosso estudo parece haver uma melhora na terceira e na quarta semana de treinamento no grupo que nadou, porém não aconteceu no grupo sedentário, visto que o IFC do grupo treinado se iguala aos do grupo controle, enquanto o grupo sedentário permanece diferente ao controle, igualando-se recém ao final da quarta semana de treino (42 dias após a lesão do nervo ciático). Esta diferença entre os dois resultados pode ser devida a um maior tempo de recuperação pós lesão, e isto tenha sido mais benéfico visto que, estudos eletrofisiológicos

prévios mostram que a reinervação funcional do membro posterior se inicia na segunda ou terceira semana após a lesão do nervo ciático em ratos e que submeter estes músculos ao esforço antes deste período pode ser prejudicial (HERBISON *et al.*, 1983). Talvez um período intermediário para iniciar a natação seja entre os períodos que foram realizados por Van Meeterem e colaboradores (1998) e o período de nosso estudo, ou seja, após uma semana da lesão do nervo ciático, visto que se inicia o processo de regeneração e talvez a influência do exercício junto com as propriedades da água aquecida, nessa fase, seja mais benéfico e possa acelerar o processo de regeneração.

A enzima AChE é a responsável primária pela rápida eliminação da acetilcolina (ACh) na junção neuro-muscular, hidrolisando-a após sua liberação em uma sinapse colinérgica, permitindo o controle temporal preciso de uma contração muscular (MASSOULIÉ *et al.*, 1993). A AChE é transportada através do axônio, ou está presente na junção neuromuscular em situações normais. No caso de lesão axonal, há uma diminuição de seu conteúdo na junção neuro-muscular, e, para que este conteúdo normalize, é necessário que seja reestabelecido o contato entre o corpo do neurônio e o órgão alvo, neste caso o músculo, através da regeneração axonal (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

A AChE possui diferentes formas moleculares, que podem ser similares em suas propriedades catalíticas, porém, diferentes nos seus parâmetros hidrodinâmicos e interações iônicas ou hidrofóbicas. As formas são distingüidas por suas estruturas quaternárias e podem ser: "A" (assimétrica, A12, A8, A4) ou "G" (globular, G4, G2, G1), sendo a G4 a forma mais encontrada na musculatura esquelética (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostram que a atividade enzimática da AChE estava presente na musculatura dos animais dos grupos experimentais, porém o conteúdo total da enzima está diferente do conteúdo total enzimático encontrado nos ratos controle. Esses resultados mostram que mesmo quando a atividade muscular, no caso do músculo gastrocnêmio, não está totalmente normalizada, a funcionalidade do membro foi reestabelecida, como mostrado nos resultados do IFC. Em um estudo que submeteu os ratos saudáveis a natação, duas vezes por dia, por 12 -15 semanas, foi encontrado aumento no conteúdo de AChE em sua forma G4 no músculo gastrocnêmio, mostrando que o exercício físico, durante o qual aumentam as contrações musculares, aumenta, também, o conteúdo enzimático de AChE na sua forma G4, por necessitar maior captação e degradação da ACh da junção neuromuscular (GRISIGER *et al.*, 1991).

Estes resultados estão de acordo com nossos resultados da atividade da enzima AChE pois, os ratos que foram submetidos a cirurgia de esmagamento do nervo ciático direito, tanto o grupo NL quanto o grupo SED, apresentaram níveis significativos de AChE. A presença de atividade da enzima AChE no músculo gastrocnêmio desnervado, significa que o processo de regeneração nervosa está presente e que já há atividade motora na musculatura desnervada.

Esta semelhança entre os resultados do grupo SED e do grupo NL, pode ser devido ao estresse dos ratos submetidos ao exercício, visto que, quando os ratos são submetidos ao exercício físico na água, isso gera uma reação de estresse no animal, pois, desde que o animal é colocado na água,

por mais que os ratos sejam hábeis a nadar, acredita-se que haja um esforço do animal para sobreviver (GOBATTO *et al.* 2001).

Um estudo mostrou que animais submetidos ao exercício físico de natação ou corrida na esteira têm seus níveis de corticosterona aumentado quando comparado com animais em repouso. Porém, as concentrações de ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) são mais altas apenas nos ratos submetidos a natação em comparação ao grupo controle mas, não apresentam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo exercitado na esteira (CONTARTEZE *et al.*, 2007). A liberação de ACTH com conseqüente síntese de glicocorticóides após um estímulo, é considerado um agente estressor, sendo que o exercício de natação desencadeia uma resposta apropriada ao estresse, aumentando os níveis de ACTH e as concentrações de corticosterona (CONTARTEZE *et al.*, 2007).

Sabe-se também que a síntese protéica e o catabolismo de proteínas muscular de galinhas, são afetados sob administração de corticóides, e respectivamente diminuído e aumentado, os quais contribuem juntos para a diminuição do acúmulo protéico durante um longo tempo de administração de corticóides (DONG *et al.*, 2007). Em ratos, a queda de proteínas miofibrilares no músculo esquelético progride através de duas fases distintas em resposta a administração crônica de glicocorticóides, uma fase inicial (4-5 dias), durante a qual aumenta a proteólise, seguida por uma fase tardia na qual a proteólise é diminuída (KAYALI *et al.*, 1987; 1990).

Estes resultados podem explicar porque o conteúdo da enzima AChE dos ratos submetidos a natação, mesmo com trabalho muscular aumentado, não retornou ao seu nível normal, uma vez que os ratos foram

submetidos ao estresse, o que levou a um aumento nos níveis de corticosterona, levando inicialmente a um aumento da proteólise, seguido de sua diminuição, que interfere diretamente na síntese protéica.

Boniseгна e colaboradores (1990) observaram que a natação na água quente induz apenas a um consumo parcial de glicogênio muscular quando comparado a natação na água fria, sendo que após 60 minutos de nado não ocorre mais depleção, pois as condições metabólicas e fisiológicas na água quente são favoráveis a realização de um exercício mais prolongado sem consumir os estoques de glicogênio muscular. Este resultado mostra um ponto favorável de nosso estudo, porém quando os ratos são submetidos a lesão, pouco se sabe em relação ao estoque de glicogênio muscular, e o quanto este é utilizado durante o exercício, visto que, no início do exercício a função muscular está quase abolida.

No entanto, sabe-se que a água quente também pode auxiliar na recuperação funcional e na regeneração através da dilatação dos vasos sanguíneos superficiais aumentando o suprimento sanguíneo periférico. Além disso, o calor da água ajuda a aliviar a dor além da redução do espasmo muscular pois, reduz a sensibilidade das terminações nervosas sensitivas (SKINNER ; THOMSOM, 1985; ROCHA, 1994; RUOTI *et al.*, 2000). Esta influência da água aquecida, que poderia estar estimulando a regeneração nervosa, também pode estar sendo influenciada pelo estresse dos animais submetidos a natação, visto que um aumento nos níveis de glicocorticóides gera uma vasoconstrição periférica (DE NICOLA, 2004), ação esta, contrária a da água aquecida.

A análise morfológica dos nervos apresentou resultados que podem ter sido interferidos também pelos motivos citados acima. Quando comparada a densidade de fibras mielínicas entre os grupos SED (10115, ± 1248), NL (12479, ± 12479) e o grupo CON (10115, ± 430), não houve diferença significativa, porém se observou uma tendência a um aumento na densidade dos grupos treinados. Estes resultados estão de acordo com outros achados de nosso laboratório, onde ratos submetidos ao treinamento na esteira ou de resistência tiveram um aumento na densidade de fibras mielínicas quando comparados ao grupo controle (ILHA *et al*, 2008).

Gutmann e Jakoubek (1963) relatam que o exercício de natação intensa, acima de quatro horas por dia, durante 35 dias, após lesão do nervo ciático, levaram a deficiência na maturação das fibras nervosas levando a diminuição no diâmetro das fibras nervosas grandes.

Em nosso estudo, as medidas da espessura da bainha de mielina (CON= $0,99 \pm 0,03$; SED= $0,46 \pm 0,01$; NL= $0,47 \pm 0,02$); área média das fibras mielínicas (CON= $40,04 \pm 1,54$; SED= $13,79 \pm 1,11$; NL= $15,85 \pm 1,07$); o diâmetro médio das fibras mielínicas (CON= $6,66 \pm 0,13$; SED= $3,95 \pm 0,15$; NL= $4,26 \pm 0,14$) e o diâmetro médio dos axônios (CON= $4,67 \pm 0,75$; SED= $3,02 \pm 0,13$; NL= $3,31 \pm 0,11$) foram menores nos grupos experimentais quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$), sendo que a estimativa entre o diâmetro da fibra e o diâmetro do axônio (razão) também foi diferente nos grupos experimentais em comparação ao grupo controle (CON= $0,70 \pm 0,00$; SED= $0,75 \pm 0,01$; NL= $0,76 \pm 0,00$, $p < 0,05$). Quando comparados com os resultados obtidos no estudo de Ilha e colaboradores (2008), pode-se observar que em relação à espessura da bainha de mielina, à área média das fibras

mielínicas e à razão, houve uma equiparação dos ratos do grupo que treinou na esteira aos ratos do grupo controle, sendo esta diferença ausente em nosso estudo. Estes resultados podem estar relacionados ao tipo de exercício realizado e a influência que este exerce sobre a regeneração nervosa, como por exemplo o estresse durante a natação.

Sabe-se que diferentes tipos de exercícios físicos podem afetar o curso da regeneração nervosa periférica por aumentar a expressão de BDNF, neurotrofina 3 (NT-3) e seus receptores tirosina-quinase (TrkB e TrkC, respectivamente), tanto na medula espinhal quanto no músculo sóleo de ratos (GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2001; YING *et al.*, 2003). Além disso, a liberação local contínua de BDNF aumenta o crescimento da fibra nervosa e induz a regeneração nervosa mais rápida após a lesão do nervo ciático de ratos (VÖGELIN *et al.*, 2006) e o BDNF endógeno é requerido para a regeneração nervosa e remielinização após uma lesão do nervo ciático em ratos (ZHANG *et al.*, 2000). Porém, pelo fato de que muitos fatores de crescimento são liberados pelo músculo e transportados retrogradamente pelo nervo intacto, em uma lesão nervosa periférica, onde existe a perda de contato entre neurônio e célula-alvo, a função regeneradora dos fatores de crescimento está alterada, ficando assim, a regeneração prejudicada.

De acordo com os objetivos do exercício sobre a regeneração, a hiperatividade do músculo sóleo, por imobilização do membro contralateral, produziu um aumento significativo no diâmetro médio das fibras de nervos intactos e em regeneração. Por outro lado, a falta de atividade física do músculo sóleo de ratos produzida pela fixação esquelética, resultou em uma redução significativa do diâmetro médio da fibra dos nervos intactos e em

regeneração (EISEN *et al.*, 1973). Este resultado pode justificar porque os ratos sedentários também apresentaram uma regeneração nervosa satisfatória, quando comparados ao grupo treinado, pois os ratos do grupo sedentário permaneceram na caixa moradia, sem imobilização, podendo mexer-se a vontade, por vezes, elevando-se sobre os membros posteriores para alcance da comida e da água. O suporte do peso corporal já foi visto como um importante fator na recuperação funcional pois ratos com compressão do nervo ciático que suportam seu próprio peso apresentam ganho na tensão tetânica muscular e na recuperação funcional, em comparação com ratos que tiveram seus membros posteriores suspensos (MATSUURA *et al.*, 2001).

A análise histológica mostrou que mesmo com a função motora recuperada, o nervo ciático de ratos que sofreram esmagamento permanecia com a presença de processos degenerativos com aparência de casca de cebola, além de apresentar macrófagos carregados de lipídios no grupo SED (Figura 14). Pode-se observar ainda, a presença de fibras com aparência gigante no grupo NL, como pode ser visto em patologias nervosas periféricas, o que indica que a fibra ainda está em degeneração (Figura 15). A presença de células de Schwann, remielinizando, e a presença de fibras mielínicas mostra que os nervos também já se encontram em um processo regenerativo, o que justifica a volta da função motora e a presença do conteúdo enzimático de AChE. Apesar dessa semelhança entre as características histológicas apresentadas pelos dois grupos experimentais, analisando qualitativamente, as fibras nervosas dos nervos ciático do grupo NL pode-se observar que elas apresentam menor tamanho, porém com maior mielinização do que as fibras

nervosas dos nervos do grupo sedentário, apesar dessa diferença não ter sido significativa nas análises morfométricas.

O comportamento dos animais durante o exercício também deve ser levado em conta. Um estudo mostrou que o comportamento de flutuação, o qual os ratos apresentaram no início do período de exercício, é dependente da temperatura da água. Foi visto que a água aquecida a 30 °C é menos aversiva do que na temperatura de 25 °C, sendo este parâmetro indicado através dos níveis de corticosterona plasmática, que foram maiores nos animais submetidos ao teste do nado forçado na água à 25 °C (BÄCHLI *et al.*, 2008). Como o comportamento de flutuação foi diminuindo conforme progredia o exercício na água aquecida a 31 °C (± 1 °C), pode-se inferir que, o exercício na água aquecida além de menos aversivo, também leva à uma adaptação dos animais ao meio, visto que não só a flutuação diminuiu mas, também, a quantidade de fezes na água. Esses resultados poderão ser confirmados posteriormente, através das medidas dos níveis de corticosterona plasmática do material previamente estocado.

Nossos dados mostraram que o exercício físico realizado na água não acelera a regeneração nervosa mas, também, não retarda, podendo até melhorar a função motora. Apesar do modelo de esmagamento do nervo ciático de roedores ser amplamente empregado na literatura, a recuperação funcional desses animais é rápida (aproximadamente 4 semanas após a lesão) mesmo sem nenhum tratamento, o que dificulta a apreciação de terapias de reabilitação neste modelo. Diante destes achados, novos estudos devem ser realizados, para maiores elucidações acerca da regeneração nervosa. Além disso, podem ser usados modelos de reparo nervoso cirúrgico, como

neurorrafia ou tubulização, que podem testar melhor a efetividade dos diferentes tipos de exercício físico.

6-CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo mostrou que a regeneração nervosa não é influenciada diretamente pelo exercício físico realizado na água, ou seja, o exercício não acelera a regeneração nervosa porém, também não retarda, podendo até melhorar a função motora. Esses dados nos levam a crer na necessidade de novos estudos, acerca da temperatura da água, se maiores temperaturas podem auxiliar na regeneração; se o tempo de duas semanas após o esmagamento não seria elevado, podendo ser, apenas uma semana necessária para o exercício ter seu efeito benéfico, ou ainda, o efeito específico do exercício na água aquecida sobre os fatores de crescimento e como o exercício após uma lesão pode atuar benéficamente sobre sua liberação.

O modelo de esmagamento do nervo ciático é bastante usado em estudos, o que, pode trazer elucidaciones no que diz respeito aos mecanismos exercidos pela atividade física sobre a regeneração nervosa, podendo ser útil para a recuperação de indivíduos acometidos de patologias nervosas periféricas, sendo, para isso, necessário maiores estudos acerca do assunto.

Através do material coletado durante o estudo, os níveis de corticosterona sangüínea serão analisados com o intuito de elucidar se o estresse está mesmo interferindo com a regeneração nervosa; se existe uma adaptação dos animais ao exercício, e se realmente existe uma correlação

entre o tempo de flutuação, a quantidade de fezes e os níveis de corticosterona plasmática. Ainda, alterações no tecido muscular poderão ser esclarecidas através da análise do tipo, tamanho e quantidade de fibras musculares, e se após o exercício existe diferença entre os grupos SED e NL.

7-REFERÊNCIAS

ANNUNCIATO, N.F. O processo plástico do sistema nervoso. *Temas sobre o desenvolvimento*.3: 4-12, 1994.

BÄCHLI, H.; STEINER, M.A.; HABBERSETZER, U.; WOTJAK, C.T. Increased water temperature renders single-housed C57BL/6J mice susceptible to antidepressant treatment in the forced swim test. *Behav. Brain. Resear.*,187, 67-71, 2008.

BRIDGE, P.M.; BALL,D.J.; MACKINNON,S.E., NARAD, Y.;BRANDT, K.; HUNTER, D.A. ;HERTL, C. Nerve crush injuries-A model for axonotmesis. *Exp. Neurol.*, 127, 284-290, 1994.

BONINSEGNA, A.; D'AMELIO, G.; CALZAVARA, M.; BERTOLINI, M. Effect of swimming in thermal water on skeletal muscle, liver and heart glycogen. *Clin. Physiol. Biochem.*, 8: 318-321, 1990.

CHEN, Z.L.; YU, W.M.; STRICKLAND, S. Peripheral Regeneration. *Ann. Rev. Neurosci.*, 30: 209-233, 2007.

COLOHAN, A.R., PITTS, L.H., ROSEGAY, H. Injury to the peripheral nerves. In: Feliciano DV, Moore EE, Mattox KL (eds). *Trauma*. 3rd ed. Stanford, Conn: Apleton e Lange, 853-62, 1996.

CONTARTEZE,R.V.L.; MACHADO, F.D.B.; GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A.R. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp. Bioch. Physiol.*, Part A. DOI: 10.101 6/j.cbpa.2007.03.005 , 2007.

DAHLIN, L.B., BRANDT, J. Basic science of peripheral nerve repair: wallerian degeneration/growth cones. *Oper. Tech. Orthop.*, 14: 138-145, 2004.

DE MEDINACELI, 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. Neur.*; 77: 634-643, 1982.

DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J. Neurosci. Methods*; 58, 29-37, 1995.

DE NICOLA, A. F. Fisiologia do córtex supra-renal. In: CINGOLANI, H.E.; HOUSSAY, A.B. (eds) *Fisiologia humana de Houssay*. Artmed, Porto Alegre, Brasil, pp 656-669, 2004.

DEZAWA, M.; MUTOH, T.; DEZAWA, A.; ADACHI-USAMI, E. Putative gap junctional communication between axon and regenerating Schwann cells during mammalian peripheral nerve regeneration. *Neurosci.*, 85:663-667, 1998.

DONG, H.; LIN, H.; JIAO, H.C.; SONG, Z.G.; ZHAO, J. P.; JIANG, K.J. Altered development and protein metabolism in skeletal muscles of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) by corticosterone. *Comp. Bioch. Physiol.*, part A, 147: 189-195, 2007.

EISEN, A.A.; CARPENTER, S.; KARPATI, G.; BELLAVANCE, A. The effect of muscle hyper-and hypoactivity upon fibre diameters of intact and regenerating nerves. *J. Neurol. Scie.*, 20: 457-469, 1973.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*; 7: 88-95, 1961.

ENGLAND, J.D., ASBURY, A.K. Peripheral neuropathy. *Lancet*, 363: 2151-2161, 2004.

FREDERICKS, C.M. Disorders of the peripheral nervous system: the peripheral neuropathies. In: Fredericks, C.M.; Saladin, L.K. (eds). *Pathophysiology of the motor systems: principles and clinical presentation*. F.A. Davis Company, Philadelphia, pp. 346-372, 1996.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; DE CASTRO RODRIGUES, A., et al. Low power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers Med. Sci.*, 19: 57-65, 2004

GISIGER, V.; SHERKER, S.; GARDINER, P.F. Swimming training increases the G4 acetylcholinesterase content of both fast ankle extensors and flexors. *FEBS Letters*: 278: 271-273, 1991.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M.A.R.; SIBUYA, C.Y.; AZEVEDO, R.M.; SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Bioch. and Physiol., Part A* 130, 21-27, 2001.

GÓMEZ-PINILLA, F.; YING, Z.; OPAZO, P.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rats spinal cord and skeletal muscle. *Eur. J. Neurosci.*, 13: 1078-1084, 2001.

GORDON, T.; SULAIMAN, O.; BOYD, J.G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J. Peripher. Nerv. Syst.*, 8: 236-250, 2003.

GUNDERSEN, H.J.G.; JENSEN, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.*, 147, 229-263, 1987.

GUTMANN, E.; JAKOUBEK, B. Effect of increased motor activity on regeneration of the peripheral nerve in young rats. *Physiol. Bohemoslov.*, 12: 463-468, 1963.

HERBISON, G. J. ; JAWEED, M. M.; DITUNNO, J. F. Reinnervating rat skeletal muscle: Effect of 35% grade treadmill exercise. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 63, 313-316, 1982.

HERBISON, G. J.; JAWEED, M. M.; DITUNNO, J. F. Exercise therapies in peripheral neuropathies. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 64: 201-205, 1983.

HERMEL, E.E.S.; ILHA, J.; XAVIER, L.L.; RASIA-FILHO, A.A.; ACHAVAL, M. Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic

volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci. Lett.*, 405, 153-158, 2006.

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

ILHA, J.; ARAUJO, R.T.; MALYSZ, T.; HERMEL, E.E.S.; 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. *Neurorehab. Neural Repair*, DOI: 10.1177/1545968307313502, 2008.

IRINTCHEV, A.; CARMODY, J.; WERNIG, A. Effects on recovery of soleus and extensor digitorum longus muscle of prolonged wheel running during a period of repeated nerve damage. *Neuroscience.*, 44: 515-519, 1991.

JAWEED, M.M.; HERBISON, G.J.; DITUNNO, J.F. Effect of swimming on compensatory hypertrophy of reinnervating soleus and plantaris muscle. *Am. J. Phys. Med.*, 53: 35-40, 1974.

JAWEED, M.M.; HERBISON, G.J.; DITUNNO, J.F. Physical Activity and inactivity influences on C-leucine incorporation in reinnervated rat gastrocnemius. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 63: 28-31, 1982.

JOHNSON, E.O.; ZOUBOS, A.B.; SOUCACOS, P.N. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury, Int. J. Care. Injured.* 365: 524-529, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, Cap. 9, pp 154-183, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

KARTJE, G.L.; SCHWAB, M.E. Axonal growth in the adult mammalian nervous system: regeneration and compensatory plasticity. In: Siegel, G.J., Alberts, R.W., Brady, S.T., Price, D.L. (eds), *Basic Neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 517-527, 2006.

KAYALI, A.G.; YOUNG, V.R.; GOODMAN, M.N. Sensitivity of myofibrillar proteins to glucocorticoid-induced muscle proteolysis. *Am. J. Physiol.*, 252: 621-626, 1987.

KAYALI, A.G.; GOODMAN, M.N.; LIN, J.; YOUNG, V.R. Insulin- and thyroid hormone-independent adaptation of myofibrillar proteolysis to glucocorticoids. *Am. J. Physiol.*, 259: 699-705, 1990.

KISNER, C.; COLBY, L.A. *Exercícios Terapêuticos: fundamentos e técnicas*. 841p, São Paulo: Manole, 1992.

LINDERMAN, E.; LEFFERS, P.; SPAANS, F.; DRUKKER, J.; REULEN, J.; KERCKHOFFS, M.; KÖKE, A. Strength training in patients with dystrophy and hereditary motor and sensory neuropathy: a randomized clinical trial. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 76: 612-620, 1995.

LOWRIE, M.B. Contralateral effects of peripheral nerve injury. *Trends Neurosci.*, 22: 496-497, 1999.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R.. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.

LUNDBORG, G.; RICHARD, P. Bunge memorial lecture. Nerve injury and repair- a challenge to the plastic brain. *J. Peripher. Nerv. Syst.*, 8: 209-226, 2003.

LUNDY-EKMAN, L. *Neurociência-Fundamentos para a Reabilitação*. 312p, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in neurobiol.*, 41: 31-91, 1993.

MATSUURA, T.; IKATA, T.; TAKATA, S.; KASHIWAGUCHI, S.; NIWA, M.; SOGABE, T.; KOGA, K. Effect of weight bearing on recovery from nerve injury in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 91: 2334-2341, 2001.

MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; HUNTER, D.A. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast. Reconstr. Surg.*, 75: 384-388, 1985.

MENDONÇA, A.C.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J. Neurosci. Methods*, 129: 183-190, 2003.

NIETO, M.; VERDÚ, E. Lesiones del sistema nervioso: respuesta neuronal y reparación. In: Delgado J.M.; Ferrús, A.; Mora, F.; Rubia, F. J. (ed), *Manual de Neurociencia*. Editorial Sintesis S.A., Vallehermoso, Madrid, pp. 929-966, 1998.

PETERS, A.; PALAY, S.,L.; WEBSTER, H. The fine structure of the nervous system- Neurons and their supporting cells. 3rd edition Oxford University Press, New York, 1991.

RASO, V.V.M.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N.; FASAN, V.S. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J. Neurosci. Methods*, 142: 185-192, 2005.

REIER, P.J. Degeneration and regeneration in the nervous system. In: Conn, P.M. (ed), *Neuroscience in medicine*. L.B. Lippincott Company, Philadelphia, pp. 593-619, 1995.

ROCHA, J.C.C. *Hidroginástica. Teoria e prática*. 103p, Rio de Janeiro : Sprint, 1994.

RODRIGO, J.; PEINADO, M.A.; SÁNCHEZ E.S. Técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopía electrónica. In: Peinado, M.A.; Pedrosa, J.A.; Rodrigo, J. (eds) *Inmunocitoquímica y técnicas relacionadas*. Universidad Jaén, Jaén, pp 177-201, 1996.

RODRIGUEZ, F.J.; VALERO-CABRÉ, A.; NAVARRO, X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discov. Today*, 1: 177-185, 2004.

RUOTI, R. G.; MORRIS, D. M.; COLE, A.J. *Reabilitação Aquática*. 1ºed., 170p, São Paulo. Manole, 2000.

SARIKCIOGLU, L.; OGUZ, N. Exercise training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. *Intern. J. Neurosci.*, 109: 173-177, 2001.

SKINNER, A. T.; THOMSON, A. M. *Duffield: Exercícios na água*. 3ºed., 220p São Paulo: Manole, 1985.

SNIDER, W.D.; ZHOU, F-Q.; ZHONG, J.; MARKUS, A. Signaling the pathway to regeneration. *Neuron.*, 35: 13-16, 2002.

TERENGUI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors, *J. Anat.*, 194: 1-14, 1999.

TONGE, D.A., GOLGING, J.P. Regeneration and repair of the peripheral nervous system. *Semin. Neurosci.*, 5: 385-390, 1993.

TRUMBLE, T.E. Peripheral nerve injury: Pathophysiology and repair. In: Feliciano DV, Moore EE, Mattox KL (eds). *Trauma*. 4th ed. New York, McGraw-Hill; 1047-55, 2000.

TUMA Jr., P.; D'AGOSTINO DIAS, M.; ARRUNÁTEGUI, G.; DUARTE, G.G.; WADA, A.; CUNHA, A.S.; FERREIRA, M.C. Effect of hyperbaric oxygen on the regeneration of experimental crush injuries of nerves. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, 54: 81-84, 1999.

VALLAT, J.M.; MAGY, L. Neurophathies périphériques: généralités. *EMC-Neurologie*, 2: 175-181, 2005.

VAN MEETEREN, N.L.U.; BRAKKEE, J.H.; HELDERS, P.J.M.; GROISET, G.; GISPEN, W.H.; WIEGANT, V.M. Recovery of function after sciatic nerve crush in rats selected for diverging locomotor activity in the open field. *Neurosci. Letters*, 238: 131-134, 1997a.

VAN MEETEREN, N.L.U.; BRAKKEE, J.H.; HAMERS, F.P.T.; HELDERS, P.J.M.; GISPEN, W.H. Exercise training improve functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 78: 70-77, 1997b.

VAN MEETEREN, N.L.U.; BRAKKEE, J.H.; HAMERS, F.P.T.; HELDERS, P.J.M.; GISPEN, W.H. The effect of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J. Peripher. Nerve Syst.*, 3:277-282, 1998.

VAREJÃO, A. S. P.; MEEK, M. F.; FERREIRRA, A. J. A.; PATRÍCIO, J. A. B.; CABRITA, A. M. S. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in rat: walking track analysis. *J. Neurosci. Methods*, 108: 1-9, 2001.

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.*, 199: 348-353, 2006.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35: 1389-1394, 2002.

WILLIAMS, P.L. *Gray's anatomy: The anatomical basis of medicine and surgery*. Cap. 8, pp.901-1397, Licensing Agency, London, 1995.

WHITING, W.C., ZERNICKE, R.F. *Biomecânica da lesão músculo esquelética*. 251p, Ed. Guanabara-Koogan, 2001.

WRIGHT, N.C.; KILMER, D.D.; McCRORY, M.A.; AITKENS, S.G.; HOLCOMB, B.J.; BERNAUER, E.M. Aerobic walking in slowly progressive neuromuscular disease: effect of a 12-week program. *Arch. Physiol. Med. Rehabil.*, 77: 64-69, 1996.

YING, Z.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R.; GÓMEZ-PINILLA, F. Voluntary exercise increase neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. *Brain Res.*, 987: 93-99, 2003.

ZHANG, J. I.; LUO, X. G.; XIAN, C. J.; LIU, Z. H.; ZHOU, X. F. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur. J. Neurosci.*, 12: 4171-4180, 2000.