



16° Congresso de Iniciação Científica

AValiação Funcional da Marcha em Ratos submetidos a Exercício Físico após Axoniotmese

Autor(es)

GABRIELA SACHETO DA SILVA

Orientador(es)

ROSANA MACHER TEODORI

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPq

1. Introdução

Os nervos são alvos freqüentes de lesões traumáticas, como o esmagamento, compressão, estiramento, avulsão e secção parcial ou total, que resultam na perda da transmissão de impulsos nervosos e diminuição ou ausência da sensibilidade e motricidade no território inervado (Monte-Raso et al., 2005).

A recuperação morfológica e funcional após uma lesão nervosa raramente é completa e perfeita, apesar da aplicação de técnicas modernas e sofisticadas de tratamento. Isso se deve aos diversos fatores que podem influenciar a regeneração de um nervo lesado, tais como a localização da lesão, o tempo de desnervação, o tipo e o diâmetro das fibras nervosas acometidas (Mendonça; Barbieri; Mazzer, 2003).

Um dos recursos utilizados para promover o retorno funcional após lesão nervosa é o exercício físico (Van Meeteren, 1997; Sarikcioglu e Oguz, 2001; Marqueste et al., 2004; Byun et al., 2005; SEO et al., 2006), que promove o restabelecimento das propriedades contráteis e metabólicas do músculo após a desnervação (Possebon et al., 2001), melhorando a função sensório-motora e prevenindo limitações decorrentes da atrofia e fraqueza muscular (Herbison, Jaweed e Ditunno, 1974, 1980).

Porém, ainda não foi estabelecida a intensidade, duração e freqüência ideais para a aplicação do exercício (SEO et al., 2006). Van Meeteren et al. (1997), Marqueste et al. (2004), Byun et al. (2004) e Seo et al. (2006) apontam que, quando iniciado na fase imediata após a lesão, o exercício pode acelerar o crescimento axonal e restaurar rapidamente a função sensório-motora, com conseqüente incremento na massa muscular, minimizando a atrofia muscular e a perda da função.

Há outros autores que discutem a utilização do exercício físico na fase tardia após a lesão, ou seja, na fase de reinervação do músculo, afirmando que deve haver um período de repouso antes do início da atividade, pois se iniciado de imediato, pode levar a um dano muscular, já que as unidades contráteis do músculo são insuficientes e a intensidade da atividade é muito alta para a condição do músculo (Herbison; Jaweed e

Ditunno, 1982; Hie et al., 1987).

Atualmente, para se estudar a recuperação das lesões nervosas periféricas, são utilizadas técnicas de eletrofisiologia, histologia e morfometria. Todos estes parâmetros são importantes para conhecer o grau de recuperação funcional. No entanto, para a avaliação da lesão e reparo de nervos, estas técnicas experimentais não são suficientes para correlacionar o retorno da função motora com o retorno das funções sensoriais (Monte-Raso et al., 1998). Devido a esta necessidade, De Medinacelli et al. (1982), desenvolveram um método de análise quantitativa da função do nervo isquiático em ratos, conhecida como Índice Funcional do Ciático (IFC), que conta com a vantagem de não ser invasivo, apresentar baixo custo, ser de simples aplicação e refletir uma interação entre o sistema sensorial e motor (VAREJÃO et al., 2004). Visando contribuir com as discussões sobre qual o melhor período para iniciar o exercício, bem como para a compreensão da intensidade e duração mais adequada do exercício após a lesão nervosa periférica, este estudo realizou avaliação funcional do nervo isquiático após axoniotmese e exercício de natação.

2. Objetivos

Analisar a influência de um protocolo de exercício de natação livre aplicado na fase aguda e tardia da regeneração do nervo isquiático de ratos, sobre as características funcionais do nervo regenerado. (Revisor, este objetivo está fiel ao meu relatório inicial e ao final.)

3. Desenvolvimento

Foram utilizados 15 ratos Wistar machos, pesando 222 ± 13 g, obtidos no biotério central da FACIS-UNIMEP. Os animais foram subdivididos aleatoriamente em 3 grupos ($n=5$): Lesão (L), Lesão+Natação Livre1 (LN1), Lesão+Natação Livre14 (LN14), mantidos em gaiolas por 28 dias, com livre acesso à água e ração comercial, sob temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os animais dos grupos LN1 e LN14 passaram por um período de adaptação a água antes de iniciar a natação, com o objetivo de adaptá-los ao exercício físico, em um tanque com profundidade de 60 cm e capacidade para 500 litros, adaptado para ratos. A temperatura da água era mantida a $32 \pm 1^\circ$ C, por meio de um aquecedor de aquário, ligado a um termostato (HARRI e KUUSELA, 1986; CARVALHO, 2001). A adaptação iniciou-se com 20 minutos no primeiro dia, e teve um acréscimo progressivo de 10 minutos a cada dia, atingindo 60 minutos no quinto dia de natação.

Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intramuscular contendo uma mistura de Ketalar[®] (Cloridrato de Ketamina - 50 mg/ml) e Rompun[®] (Cloridrato de Tiazina - 2g/100ml), na proporção de 1:1, na dose de 0,3 ml/100g de peso corporal, seguida de tricotomia e assepsia da região glútea esquerda. Os planos cutâneo e muscular foram afastados até a visualização e exposição do nervo, que foi esmagado por uma pinça hemostática adaptada, realizando-se quatro pinçamentos com duração de 20 segundos e intervalo de um segundo entre eles (Fernandes et al., 2005). Em seguida, os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio de algodão 6-0 ETHICON.

Após 24 horas da lesão nervosa, os animais do grupo LN1 foram submetidos à natação diária. O grupo LN14 iniciou a natação no 14º dia pós-operatório. A água foi mantida na temperatura de $32 \pm 1^\circ$ C, profundidade de 40 cm, por um período de 14 dias, 30 minutos/dia, 5 vezes por semana, respeitando os finais de semana e sempre no período vespertino. Após cada sessão, os animais eram secados com toalha

de pano e jato de ar quente e recolocados nas gaiolas.

Para o registro das pegadas, cada animal foi colocado em um corredor de 8,2 x 42 cm, com acesso a uma caixa escura (DE MEDINACELLI et al., 1982; BAIN, MACKINNON e HUNTER, 1989). Uma tira de papel branco foi posicionada sobre o corredor para registro das pegadas. As patas posteriores foram marcadas com tinta preta de impressão digital. A seguir, cada animal era posicionado no início do corredor, por onde caminhava em direção ao ambiente escuro, deixando impressas as faces plantares das patas (normal e experimental) de acordo com De Medinacelli et al. (1982) e Varejão et al. (2004). Este procedimento foi realizado, no período pré-operatório, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o pós-operatório.

O IFC foi calculado por meio de um paquímetro digital (MITUTOYO®). Foi obtida a distância entre a extremidade do terceiro dedo e calcâneo - Comprimento da Pegada (PL); distância entre o primeiro e o quinto dedo - Largura da Pegada (TS) e distância entre o segundo e quarto dedo - Largura Intermediária da Pegada (ITS) das patas experimental (E) e normal (N) (BAIN, MACKINNON e HUNTER, 1989; VAREJÃO et al., 2004).

Os dados obtidos foram aplicados em uma fórmula proposta por Bain, Mackinnon e Hunter (1989). Valores próximos a 0 (zero) representam a função normal ou ausência de disfunção e valores próximos a -100 (menos cem) (VALORES INFERIORES A 100) representam a perda total da função nervosa (DE MEDINACELLI, 1982). (Revisor, a redação desta frase está correta, pois os valores de análise para este teste é de zero a menos cem.)

Após 28 dias, os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical. (ISSO CONSTA NO COMITE DE ÉTICA?) (Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UFSCar).

Para verificar as pressuposições dos testes estatísticos, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para normalidade dos dados. Em seguida, como os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Friedman para comparação intragrupos da análise funcional da marcha e o teste de Kruskal-Wallis para comparações intergrupos. Os dados foram processados no *software* BioEstat 4.0®, considerando $p < 0,05$.

4. Resultado e Discussão

Na comparação intergrupos dos valores do IFC (Figura 1), todos os grupos apresentaram o mesmo padrão funcional. No período pré-operatório, os valores de IFC refletiram função normal. (DEMONSTRARAM QUE OS MÚSCULOS EM QUESTÃO ESTAVAM ÍNTEGROS) (Revisor, que não podemos afirmar que os músculos estavam íntegros porque não fizemos análise histológica do músculo. Apenas podemos discutir os NOSSOS resultados. Entretanto, como os dados de IFC mostram que no período pré-operatório, os músculos não estavam desnervados e refletiram função normal. O mesmo ocorreu após o período em que a reinervação ocorreu.). Os valores obtidos no período pré-operatório neste estudo, estão entre 0 e -20, o que, segundo Dash et al. (1996), reflete uma função normal.

No 7^o e 14^o dia PO esses valores diminuíram, chegando próximos a -100, refletindo (SIGNIFICANDO)(Revisor, pelo mesmo motivo já justificado no parágrafo anterior optamos por manter o termo “refletindo”.) , perda funcional. Van Meeteren et al. (1997), relatam que a lesão nervosa interrompe de forma efetiva a passagem de informações através do nervo. Já entre o 21^o e 28^o PO, os valores encontrados sugerem recuperação funcional, uma vez que, após o 14^o dia PO tem início a reinervação muscular, quando 25% das fibras musculares estão poliinervadas (Carmignoto et al., 1983).. Não houve diferença significativa entre os grupos nos diferentes períodos de avaliação ($p > 0,05$). No 21^o dia PO, evidenciam-se valores de IFC próximos de zero, caracterizando recuperação funcional relacionada ao pico de poliinervação (GORIO et al., 1983). Já no 28^o dia PO, esses valores refletem condição funcional compatível com a de nervos normais, pois a regeneração prossegue, ocorrendo eliminação sináptica até conseqüente monoinervação (GORIO et al., 1983).

Observou-se diferença significativa na comparação intragrupos, entre os tempos de análise. No grupo L e

LN14 verificou-se que o 7º e o 14º dia PO diferiram somente do período pré-operatório ($p < 0,05$), enquanto no grupo LN1 a diferença ocorreu entre o 7º dia PO quando comparado ao pré-operatório e no 21º e 28º dias PO, quando comparados ao 7º dia PO ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Os grupos tiveram uma evolução semelhante. A atividade física iniciada na fase aguda da lesão não acelerou a recuperação funcional, mas não foi prejudicada pelo exercício FÍSICO (SUA INTRODUÇÃO DIZ QUE O EXERCÍCIO FÍSICO PODE ALTERAR FAVORAVELMENTE A REGENERAÇÃO NERVOSA. SERIA NATURAL, PORTANTO, QUE VOCÊ ENCONTRASSE EM SEUS RESULTADOS, QUE O EXERCÍCIO FÍSICO NÃO "PREJUDICOU" ESSA REABILITAÇÃO.) (Revisor, Há estudos que apontam que a atividade física extenuante na fase aguda da regeneração nervosa pode prejudicar a reinervação e recuperação funcional. Por isso é importante apontar que o protocolo de intervenção aplicado neste estudo não prejudicou a recuperação funcional, portanto pode-se considerar que não foi intenso o suficiente para prejudicar a regeneração nervosa e reinervação muscular. Então, pretendemos manter o texto do resumo como está.).

Isto reforça a importância do início da atividade precocemente (COMO VOCÊ CONCLUI ISSO, SE A EVOLUÇÃO DA LESÃO DOS GRUPOS FOI SEMELHANTE, OU SEJA, NÃO HOUVE DIFERENÇA ENTRE O EXERCÍCIO FÍSICO IMEDIATO E TARDIO?) (HERBISON, JAWEED e DITUNNO, 1974, 1980), (Revisor, a resposta para esta pergunta está na frase seguinte: A sugestão de que a atividade física deve ser iniciada precocemente se sustenta pelos benefícios do exercício precoce para a manutenção da integridade do músculo, apontados na literatura. Como a recuperação funcional depende da integridade do músculo e do nervo, se o exercício é benéfico para o músculo e não interfere na regeneração nervosa, é razoável pensar que a indicação do exercício na fase aguda da regeneração nervosa possa trazer benefícios futuros à recuperação funcional.) já que nesta fase o exercício promove o restabelecimento das propriedades contráteis e metabólicas do músculo (POSSEBON et al., 2001), melhorando a função sensório-motora e prevenindo limitações decorrentes da atrofia e fraqueza muscular (HERBINSON, JAWEED e DITUNNO, 1974, 1980).

5. Considerações Finais

Considerando a análise funcional da marcha em ratos submetidos a axoniotmese do nervo isquiático, observou-se que houve retorno gradual da função após a lesão nervosa, independentemente da realização do exercício físico.

No grupo submetido à natação na fase aguda da lesão, o exercício não acelerou o processo de recuperação funcional, porém este não foi prejudicado, o que sugere a indicação do exercício nessa fase.

Referências Bibliográficas

Bain, J.R.; Mackinnon, S.E.; Hunter, R.T. Functional Evaluation of complete sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg**. 1989; 83 (1): 129-38.

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

DASH, H; et al. Evaluation of nerve recovery from minimal-duration crush injury. **Ann Plast Surgery**. N.37, p. 526-31, 1996.

- DE MEDINACELLI, L; FREED, WJ; WYATT, RJ. An index of the function condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp Neurol**. Vol. 77, p. 6634-43, 1982.
- FERNANDES, K. C. B. G.; et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Rev Bras Fisiot**, São Carlos – SP, v.9, n. 2, p. 235-241, 2005.
- GORIO, A. et al. Muscle reinnervation-II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neurosci**, v. 8, n. 3, p. 403-416, 1983.
- HARRI, M; KUUSELA, P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? **Acta Physiol Scand**, v. 126, p. 189-197, 1986.
- HERBINSON, G.J; JAWEED, M.M; DITUNNO, J.F. Effects of swimming on reinnervation of rat skeletal muscle. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.37, p. 1247-1251, 1974.
- HIE, H. B; VAN VIE, C. J; VERMCULEN-VAN, D. E. R. E. Twitch tension, muscle weight and fiber area of exercised reinnervating rat skeletal muscle. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 63, p. 608-612, 1982.
- MARQUESTE, T.; et al. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. **J Appl Physiol**, v. 33, n. 9, p. 492-501, 2004.
- Mendonça, A.C.; Barbieri, C.H.; Mazzer, N., Directly low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **J Neurosci Methods**. 2003: 129: 183-90.
- Monte Raso, V.V.; Barbieri, C.H.; Mazzer, N. Índice Funcional do Ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: avaliação da reprodutividade do método entre examinadores. **Acta Ortop Bras**. 2006; 14 (3): 133-136.
- POSSEBON, S; et al. Efeitos do Treinamento físico e da Creatina Magnésio em músculos desnervados de Ratos. **Rev Médica Hsvp**. Vol.13, n. 29, p. 16-21, 2001.
- ROBINSON, L. R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle & Nerve**, v. 23, p. 863-868, 2000.
- SARIKCIOGLU, L, OGUZ, N. Exercise Training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. **Int J Neuroscience**, v. 109, p. 173-7, 2001.
- SEO, T. B., et al. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. **J Amer Col Sports Med**. v. 38, n. 7, p. 1267-76, 2006.
- VAN MEETEREN, N.L.U., et al. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. **Arch Phys Med Rehabil**, v.78, n. 1, p. 70-77, 1997.
- VAREJÃO A.S.P.; et al. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. **Neurol Res**. Vol. 26, n. 2, p.186-94, 2004.

Anexos

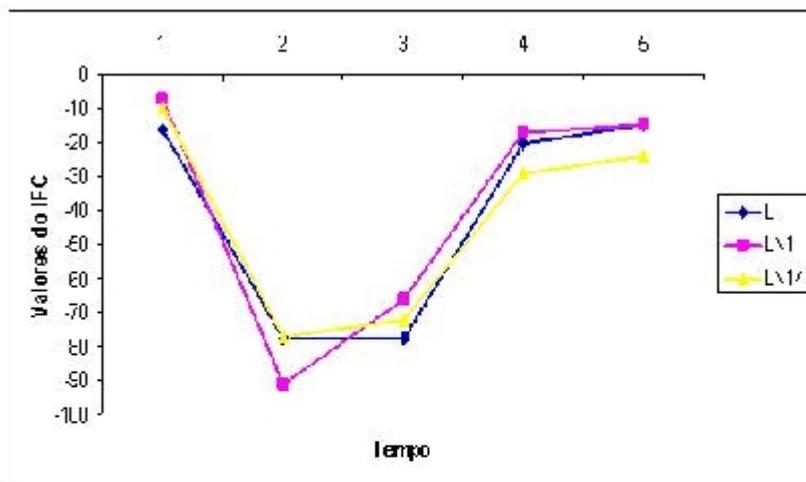


Figura 1: Comparações, mergeiros dos períodos de análise do Índice Funcional do Ombro (IFC): Lesão (L); Lesão + NL1 (LNT); Lesão + NL14 (LNT14); ($p > 0,05$)

Tabela 1: Valores médios e DP do IFC dos grupos Lesão, Lesão + NL1 e Lesão + NL14, em todos os períodos de análise. ($p > 0,05$) em comparação de cada grupo com o grupo controle.

	L	LNT	LNT14
Pré-operatório	75,18 (14,24)	77,73 (17,57)	81,76 (17,46)
7º dia	77,72 (21,17)	87,28 (20,26)*	77,52 (25,46)*
14º dia	78,55 (13,66)	85,68 (17,77)	77,15 (16,66)
21º dia	85,22 (15,57)	87,41 (17,77)	80,07 (17,17)
28º dia	74,77 (19,77)	74,81 (12,87)	74,26 (17,57)