



## 9º Congresso de Pesquisa

# REGENERAÇÃO NERVOSA E REINERVAÇÃO MUSCULAR APÓS AUTOENXERTO DE NERVO E APLICAÇÃO DE RECURSO FISIOTERAPÊUTICO EM RATOS

### Autor(es)

---

ROSANA MACHER TEODORI

### Co-Autor(es)

---

JOICE BETINI  
ADRIANA PERTILLE

## 1. Introdução

---

Em lesões do tipo neurotmese, o axônio regenerado não recupera sua estrutura original nem a função completa, estando a velocidade de condução nervosa e a excitabilidade abaixo dos níveis normais, o que reflete na recuperação dos órgãos reinervados (WALDRAM, 2003), comprometendo as atividades de vida diária e laborais.

Estudos tem avaliado o efeito de diferentes técnicas de reparo nervoso, porém poucos investigaram a influência de recursos fisioterapêuticos relacionados à facilitação do reparo nervoso, da reinervação muscular e recuperação funcional após reparo cirúrgico de nervos.

O exercício físico favorece a recuperação das propriedades contráteis e metabólicas do músculo após desnervação (TANAKA; TSUBAKI; TACHINO, 2005), ajuda a remover a mielina degenerada e sua posterior síntese (SARIKCIOGLU; OGUZ, 2001), favorece a recuperação do diâmetro axonal (OLIVEIRA et al., 2008) e o brotamento axonal, o que promove a regeneração de nervos lesados e recuperação funcional (SEO et al., 2006).

Na axoniotmese, o exercício de natação, tem trazido benefícios à recuperação morfológica e funcional em ratos (OLIVEIRA et al., 2008), entretanto, o prognóstico da neurotmese é menos favorável, sendo importante conhecer a influência do exercício de natação sobre a regeneração axonal, reinervação muscular e recuperação funcional após autoenxerto de nervo.

## 2. Objetivos

---

Analisar a influência de um programa de exercício de natação sobre as características morfológicas do nervo isquiático regenerado após autoenxerto de nervo; investigar a distribuição das junções neuromusculares no músculo sóleo, nos diferentes tempos e grupos experimentais; avaliar a recuperação funcional nos diferentes grupos e tempos de sobrevivência.

## 3. Desenvolvimento

---

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (039/2008), 50 ratos Wistar ( $198 \pm 12$  g) foram divididos nos grupos: Controle (C): sem lesão ou intervenção (n=5); Lesão (L): secção do nervo isquiático mantendo as extremidades no leito sem conexão (n=15); Autoenxerto de Nervo (E): secção de um fragmento nervoso com reimplante imediato (n=15); Natação (N): secção de um fragmento nervoso com reimplante imediato + exercício de natação (n=15). Nos grupos L, E e N, os dados foram coletados após 4, 8 e 12 semanas, totalizando 20, 40 e 60 sessões de exercício, respectivamente, no grupo N.

Antes da lesão nervosa, o grupo N foi submetido à adaptação à água (5 dias), nadando em tanque com 30 cm de água, sem carga, T°

de  $31 \pm 2^\circ\text{C}$ . A adaptação durou 20 min. no primeiro dia, sendo acrescidos 10 min. a cada dia.

Realizou-se a análise funcional da marcha de acordo com De Medinacelli, Freed e Wyatt (1982), sendo os registros tomados no período pré-operatório e a cada 7 dias no pós-operatório (PO), de acordo com os respectivos tempos de sobrevivência. Os valores obtidos foram aplicados na fórmula definida por Bain, Mackinnon e Hunter (1989), cujo resultado aponta o grau de funcionalidade da marcha. Para lesão nervosa os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de uma mistura de Dopalen® (Cloridrato de Cetamina - 1,16g/10mL) e Rompun® (Cloridrato de Xilazina - 2g/100mL), na proporção de 3:2, em dose de 0,09mL/100g e 0,06mL/100g de massa corporal, respectivamente. O nervo foi exposto e um fragmento de 8 mm foi retirado, invertido a  $180^\circ$  e reimplantado por 4 pontos de sutura epineural (grupos E e N), ou os cotos mantidos no leito sem conexão (grupo L). Após fechamento da ferida cirúrgica, os animais foram mantidos em biotério por 4, 8 ou 12 semanas, de acordo com o grupo experimental.

Após 24 horas da lesão, o grupo N foi submetido à natação diária, sem carga adicional, por 4, 8 ou 12 semanas, 30 min/dia, 5 dias/semana, em tanque com água a  $40^\circ\text{C}$  e  $T^\circ = 31 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Ao final de cada período os animais foram anestesiados, o nervo isquiático e músculo sóleo coletados e processados para análise morfométrica e imunohistoquímica, respectivamente.

Os músculos foram processados de acordo com Marques et al. (2006), para análise das Junções Neuromusculares (JNMs), sendo quantificados o número de JNMs e a porcentagem de mono e poliinervação nas 3 camadas de fibras mais superficiais de cada músculo.

O nervo isquiático foi processado para análise morfométrica, sendo obtido o número e o diâmetro dos axônios e das fibras nervosas mielínicas, a espessura das bainhas de mielina e a razão G (SANTO NETO et al., 1998; 2004).

Aplicou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para análise do número de JNMs, número de axônios e dados morfométricos foi utilizado o teste Anova-F seguido de Tamhane. Os testes Anova-F medidas repetidas, seguido de Bonferroni avaliaram o Índice Funcional do Ciático (IFC) intragrupos, enquanto o teste Anova-F seguido de Tamhane, analisou o IFC intergrupos. Utilizou-se o SPSS/PC - 13.0), considerando  $p < 0,05$ .

#### 4. Resultado e Discussão

---

##### Número de Axônios

No grupo L não se observou axônios nos diferentes períodos de análise. Após 4 semanas, o número de axônios nos grupos E e N foi menor que no grupo C, enquanto no grupo N foi maior que no grupo E. Após 8 semanas, o número de axônios foi maior no grupo N comparado ao C, assim como quando comparado ao grupo E. Após 12 semanas, os grupos E e N apresentaram maior número de axônios em relação ao grupo C ( $p < 0,05$ ).

Le Beau, Elisman e Powell (1988) e Fields e Ellisman (1996) observaram axônios mielínicos a partir da 5ª ou 6ª semana após o enxerto. Para Navarro, Vivo e Valero-Cabre (2007), a taxa de regeneração axonal alcança 3-4mm/dia em lesões por esmagamento, sendo mais lenta (2-3mm/dia) após a secção e reparo nervoso.

O maior número de axônios no grupo N que no E após 4 semanas da lesão, assim como ocorreu entre o E e N após 8 semanas, sugere que o exercício de natação acelerou o brotamento axonal.

##### Morfometria

Após 4 semanas, o diâmetro dos axônios e das fibras nervosas era maior no grupo C, sendo que no grupo N os valores foram maiores que no grupo E. A espessura da mielina nos grupos E e N foi menor que no grupo C ( $p < 0,05$ ).

Após 8 semanas o diâmetro dos axônios e das fibras nervosas foi menor nos grupos E e N em relação ao C ( $p < 0,05$ ). Nos grupos 12 semanas o diâmetro dos axônios e das fibras nervosas foi menor no grupo E que no grupo C. No grupo N o diâmetro das fibras foi maior que no grupo E ( $p < 0,05$ ).

A razão G não diferiu entre todos os grupos estudados ( $p > 0,05$ ).

Para Verdú et al. (2000), a maturação axonal raramente atinge valores controle e apenas 75% do diâmetro das fibras é recuperado após 6 meses da axoniotomia. Oliveira et al. (2008) observaram 68,7% de recuperação do diâmetro das fibras nervosas 30 dias após submeter ratos a axoniotomia e natação.

A espessura da bainha de mielina é proporcional ao diâmetro do axônio, havendo um controle do axônio sobre a bainha de mielina que o envolve. Portanto, a diminuição do diâmetro axonal após degeneração/regeneração implica em redução da bainha de mielina (FRAHER; DOCKERY, 1998).

Para Anselin, Fink e Davey (1997), valores normais para razão G estão entre 0,6 e 0,7. Valores inferiores a 0,6 ou superiores a 0,7 indicam alteração da velocidade de condução nervosa. Os resultados deste estudo indicam que a natação não influenciou na velocidade de condução do impulso nervoso.

##### JNM

O grupo C apresentou 32 JNMs monoinervadas, que caracterizam a JNM normal do animal adulto. Como esperado, No grupo L não se observou nenhuma JNM inervada em todos os períodos estudados.

No grupo E, a reinervação foi observada após 8 semanas da lesão, estando a maioria das JNMs poliinervada. Entretanto, após 12 semanas da lesão, 44% das JNMs permaneciam poliinervadas neste grupo.

Constatou-se que no grupo N a reinervação iniciou nas primeiras semanas, estando todas as JNMs poliinervadas e, nos períodos seguintes, o processo de eliminação sináptica ocorreu de forma gradual (62% de JNMs poliinervadas após 8 semanas e 13% após 12

semanas), indicando que o exercício acelerou o brotamento e a maturação axonal, além da reinervação muscular ainda na fase inicial da regeneração, conforme também relatado por Van Meeteren et al. (1997) e Sarickcioglu e Oguz (2001).

#### IFC

No período pré-operatório todos os grupos apresentaram função normal (IFC entre 0 e -20). Nas primeiras 3 semanas após a lesão, esses valores permaneceram entre -100 e -80, apontando perda de função em todos os grupos, não havendo diferença entre eles ( $p>0,05$ ).

Entre a 1ª e a 5ª semana PO o IFC estava entre -100 e -80 em todos os grupos. A partir da 6ª e 7ª semanas o grupo N atingiu valores entre -80 e -70, enquanto no grupo L os valores permaneceram próximos de -100, porém, não houve diferença entre os grupos ( $p>0,05$ ).

Ao longo do tempo, o grupo L apresentou valores ainda mais negativos, enquanto nos grupos E e N houve melhora progressiva. Da 8ª a 11ª semana o IFC do grupo L foi mais negativo que nos grupos E e N ( $p<0,05$ ). Estes resultados já refletem a impossibilidade de reconexão com o órgão alvo e a evolução da atrofia muscular devido à desnervação. No grupo N os valores de IFC foram mais positivos que os do grupo E na 10ª e 11ª semanas PO ( $p<0,05$ ). Yao et al. (1998) também observaram completa incapacidade funcional em ratos após 12 semanas da secção do nervo isquiático sem reparo cirúrgico. Os resultados do grupo N mostram que o exercício favoreceu a recuperação funcional, provavelmente pela aceleração da reinervação e eliminação sináptica. Resultados semelhantes foram encontrados por Yavuzer et al. (2002). É possível que os estímulos táteis, térmicos e proprioceptivos fornecidos durante o exercício de natação tenham favorecido a plasticidade do sistema nervoso, pois sendo a desnervação unilateral, a ação bilateral das patas torácicas e pélvicas durante a natação pode ter estimulado o processo de ativação cruzada. Segundo Kristeva, Cheyne e Deecke (1991), contrações submáximas unilaterais podem produzir ativação homóloga contralateral. Além disso, a ativação de músculos desnervados promove a elevação da densidade e fluxo dos capilares sanguíneos do músculo (HUDLICKA et al., 1982), mantendo as condições metabólicas das fibras musculares, prevenindo sua atrofia e favorecendo a regeneração nervosa (AAS et al., 2002).

Na análise intragrupo os valores foram mais negativos em todos os períodos nos grupos L, E e N em relação ao pré-operatório após 4 e 8 semanas ( $p<0,05$ ).

Após 12 semanas, não houve recuperação da funcionalidade nos grupos L, E e N. Entretanto, no grupo N os valores encontrados na 9ª, 10ª e 11ª semana PO foram mais positivos que na 1ª semana. O IFC foi mais positivo na 11ª semana quando comparado à 1ª, 2ª e 3ª semanas PO ( $p<0,05$ ). Estes resultados apontam para os benefícios do exercício de natação sobre a recuperação funcional.

## 5. Considerações Finais

---

O protocolo de natação proposto favoreceu o brotamento e maturação das fibras nervosas na fase inicial da regeneração nervosa e acelerou o processo de eliminação sináptica após autoenxerto de nervo, além de acelerar a recuperação funcional quando aplicado logo após a desnervação.

## Referências Bibliográficas

---

AAS, V.; TORBLA, S.; ANDERSEN, M.H.; JENSEN, J.; RUSTAN, A.C. Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell model of hyperglycemia. *Ann N Y Acad Sci*, 967: 506-15, 2002.

ANSSELIN, A.D.; FINK, T.; DAVEY, D.F. Peripheral nerve regeneration through nerveguides seeded with Schwann cells. *Neurophatol Appl Neurobiol*, 23: 387-98, 1997.

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*, 83(1): 129-38, 1989.

DE MEDINACELI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. An index of the function condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*, 77: 634-43, 1982.

FIELDS, R.D.; ELLISMAN, M.H. Axons regenerated through silicone tube splices. II. Functional morphology. *Exp Neurol*, 92: 61-74, 1996.

FRAHER, J.; DOCKERY, P. A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. *J Anat*, 193 (2): 195-201, 1998.

HUDLICKA, O.; DODD, L.; RENKIN, E.M.; GRAY, S.D. Early changes in fiber profile and capillary density in long-term stimulated muscles. *Am J Physiol*, 243(4): 528-35, 1982.

KRISTEVA, R.; CHEYNE, D.; DEECKE, L. Neuromagnetic fields accompanying unilateral and bilateral voluntary movements:

topography and analysis of cortical sources. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 81: 284-298,1991. .

LE BEAU, J.M.; ELISMAN, M.H.; POWELL, H.C. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicon tubes. *J Neurocytol*, 17: 161-172, 1988.

LOVE, F.M.; SON, Y.J.; THOMPSON, W.J. Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J Neurobiol*, 54: 566-76, 2003.

MARQUES, M.J.; CARVALHO, C.L.T.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H. Terminal Schwann cell distribution at the neuromuscular junction of the dystrophin-deficient mdx mice. *Braz J Morphol Sci*, 23: 217-222, 2006.

NAVARRO, X.; VIVO, M.; VALERO-CABRE, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progr Neurobiol*, 82: 163-201, 2007.

OLIVEIRA, L.S.; SOBRAL, L.L.; TAKEDA, S.Y.M.; BETINI, J.; TEODORI, R.M. Estimulación eléctrica y natación en la fase aguda de la axonotmesis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperación funcional. *Rev Neurol*, 47(1): 11-15, 2008.

SANTO NETO, H.; TEODORI, R.M.; SOMAZZ, M.C.; MARQUES, M.J. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. *Br J Plast Surg*, 51(7): 555-60, 1998.

SANTO NETO, H.; PERTILLE, A.; TEODORI, R.M.; SOMAZZ, M.C.; MARQUES, M.J. Primary nerve repair by muscle autografts prepared with local anesthetic. *Microsurgery*, 24(3): 188-93, 2004.

SARIKCIOGLU, L.; OGUZ, N. Exercise training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. *Intern J Neurosci*, 109(3-4): 173-7, 2001.

SEO, T.B.; HAN, I.S.; YOON, J.H.; HONG, K.E.; YOON, S.J.; NAMGUNG, U.K. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. *Med Sci Sports Exerc*, 38(7): 1267-76, 2006.

TANAKA, S.; TSUBAKI, A.; TACHINO, K. Effect of exercise training after partial denervation in rat soleus muscles. *J Phys Ther Sci*, 17(2): 97-101, 2005.

VAN MEETEREN, N.L.U.; BRAKKEE, J.H.; HAMERS, F.P.T.; HELDERS, P.J.M.; GISPEN, W.H. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil*, 78 (1): 70-77, 1997.

VERDÚ, E.; CEBALLOS, D.; VILCHES, J.J.; NAVARRO, X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst*, 5 (4): 191-208, 2000.

WALDRAM, M. Peripheral nerve injuries. *Trauma*, 5: 79-96, 2003.

YAO, M.; INSERRA, M.M.; DUH, M.J.; TERRIS, D.J. A Longitudinal, Functional Study of Peripheral Nerve Recovery in the Mouse. *Laryngoscope*, 108: 1141-1145, 1998.

YAVUZER, R.; AYLAN, S.; LATIFOGLU, O.; ATABAY, K. Turnover epineural sheath tube in primary repair of peripheral nerves. *Ann Plast Surg*, 48: 392-400, 2002.