

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

JEAN CARLOS DEBASTIANI

**AÇÃO DA PROTEÍNA SERICINA EM LESÃO NERVOSA
ISQUIÁTICA, ASSOCIADA AO EXERCÍCIO FÍSICO DE
NATAÇÃO, EM RATOS WISTAR**

CASCAVEL – PR

Agosto/2017

JEAN CARLOS DEBASTIANI

**AÇÃO DA PROTEÍNA SERICINA EM LESÃO NERVOSA
ISQUIÁTICA, ASSOCIADA AO EXERCÍCIO FÍSICO DE
NATAÇÃO, EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de Concentração: Processo saúde-doença.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini

CO-ORIENTADORES: Prof. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro e Prof. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão

CASCADEL – PR

Agosto/2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

JEAN CARLOS DEBASTIANI

**AÇÃO DA PROTEÍNA SERICINA EM LESÃO NERVOSA ISQUIÁTICA,
ASSOCIADA AO EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO, EM RATOS WISTAR**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini (Orientador)
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Prof. Dr.^a Márcia Miranda Torrejais
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

CASCAVEL-PR

Agosto/2017

AGRADECIMENTOS

... Ao Prof. Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini, meu orientador, que embasou este trabalho com conhecimento, responsabilidade, compromisso, paciência e muita dedicação nesses dois anos de parceria, pela oportunidade e confiança que me conferiu.

... A Prof. Dr.^a Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro e a Prof. Dr.^a Rose Meire Costa Brancalhão, pelos seus conhecimentos, contribuições, ensinamentos, paciência e dedicação ímpar na construção e desenvolvimento deste estudo.

... A todo o pessoal do Laboratório, pelos ensinamentos e colaboração nos diversos fins de semana de treinos e coletas, sempre com bom humor e responsabilidade.

...A todos os professores do Mestrado, que compartilharam conhecimentos ao longo desses dois anos e muitas vezes ajudaram na construção da pesquisa.

...A todos os funcionários da Unioeste, pois sem eles esse trabalho seria impossível de se realizar.

... A minha turma de mestrado e aos amigos mestrados pelo aprendizado, os momentos de alegrias e dificuldades que dividimos.

... A minha família e a minha esposa pelo apoio incondicional, amor, cumplicidade e compreensão pelos momentos de ausência.

A todos, muito obrigado!!

RESUMO GERAL

Lesões no sistema nervoso periférico implicam em alterações na função motora voluntária, levando ao aumento da morbidade, incapacidades nas atividades laborais e de vida diária, com conseqüente aumento dos custos para o sistema de saúde público. Na busca de tratamentos efetivos, estudos têm demonstrado que o exercício físico é eficiente na recuperação funcional após lesão do nervo isquiático, sendo que a natação pode produzir a aceleração no processo de regeneração nervosa. Além disso, diversos produtos vêm sendo investigados no intuito de auxiliar a recuperação, no caso da proteína da seda sericina, estudos apontam sua ação no processo de cicatrização, contribuindo na regeneração tecidual em lesões crônicas. Observados estes aspectos, esta pesquisa teve por objetivo verificar o papel da sericina associada a um protocolo de exercício de natação, com sobrecarga, no reparo do nervo isquiático de ratos *Wistar* após compressão nervosa. Para tanto, foram utilizados 80 animais divididos em cinco grupos de 16 animais cada, sendo: controle (CON), lesão (LES), lesão-sericina (LSER), lesão-natação (LNAT) e lesão-sericina-natação (LSRNT). Os animais dos grupos LES, LSER, LNat e LSRNT foram submetidos à compressão do nervo isquiático, porém somente LSER e LSRNT receberam a aplicação de proteína sericina hidrolisada diretamente sobre a lesão nervosa no momento da cirurgia. Os grupos LNat e LSRNT realizaram exercício de natação com carga de 10% do peso corporal do animal, por ciclos de cinco dias de treino e dois de descanso, de 1 ou 3 ciclos, de acordo com os tempos de eutanásia, e com progressão de tempo, sendo no primeiro ciclo 15 minutos de exercício, no segundo 20 minutos e 25 minutos no terceiro ciclo. Durante o período experimental, os animais foram avaliados quanto à nocicepção, pelo teste de filamento tipo "Von Frey" digital e análise de função por meio do índice funcional do isquiático. A eutanásia foi realizada em duas etapas, sendo metade da amostra eutanasiada no 8º dia de pós-operatório, e o restante no 22º dia. Dois fragmentos do nervo, distais à lesão nervosa, foram coletados e preparados para análise em microscopia de luz, corado com hematoxilina-eosina e pré-corado com tetróxido de ósmio respectivamente, sendo observadas as características morfológicas e morfométricas da fibra nervosa. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente quanto sua normalidade e realizado ANOVA unidirecional, com pós-teste de LSD. Em relação aos animais eutanasiados no oitavo dia, a sericina aplicada diretamente sobre a lesão nervosa isquiática, apresentou características pró-inflamatórias, já a natação isolada mostrou melhora da hipernocicepção em relação às demais intervenções. Não houve sinais de aceleração do processo de reparo nervoso no oitavo dia após a lesão. Já em relação aos animais eutanasiados no 22º dia, a associação do tratamento de sericina e natação evidenciou um efeito regulador da ação pró-inflamatória da sericina pelo exercício resistido de natação, já a sericina isolada provocou exacerbação do processo inflamatório e o exercício de natação resistido, mostrou boa evolução quanto ao limiar nociceptivo e alodinia.

Palavras-chave: Biomateriais, Compressão nervosa, Exercícios em meio aquático, Proteína da seda.

GENERAL ABSTRACT

ACTION OF SERICIN PROTEIN IN ISCHIATIC NERVOUS INJURY, ASSOCIATED WITH PHYSICAL EXERCISE OF SWIMMING, IN WISTAR RATS

Lesions in the peripheral nervous system imply active in voluntary motor function, leading to increased morbidity, incapacities in work activities and daily life, with consequent increase in costs for the public health system. Effective treatments research, studies have shown that physical and efficient exercise in functional recovery after the development of the nervous system, which is not a process of nerve regeneration. In addition, several products are being investigated with no intention to aid recovery, there are no cases of sericin silk protein, studies indicate its action in the healing process, contributing in the tissue regeneration in chronic lesions. The aim of this study was to verify the role of sericin associated with a swimming exercise protocol, with overload, without repair of the sciatic nerve of Wistar rats after nerve compression. For this purpose, 80 animals were divided into five groups of 16 animals each, being: control (CON), Injury (LES), injury-sericin (LSER), injury-swimming (LNAT) and injury-sericin-swimming (LSRNT). The animals of the LES, LSER, LNAT and LSRNT groups were submitted to compression of the sciatic nerve, however LSER and LSRNT received an application of hydrolyzed sericin protein directly on a nerve lesion at the time of surgery. The LNAT and LSRNT groups underwent swimming exercise with a load of 10% of the body weight of the animal, for cycles of five days of training and two of rest, of 1 or 3 cycles, according to the euthanasia times, and with progression of time, being in the first cycle 15 minutes of exercise, in the second 20 minutes and 25 minutes in the third cycle. During the experimental period, animals as well as nociception, by the digital "Von Frey" filament test and function analysis by means of the functional index of the ischiatic. Euthanasia was performed in two stages, the sample being euthanized on the 8th postoperative day, and the remainder on the 22nd day. Two fragments of the nerve, distal to the nerve injury, were collected and prepared for light microscopy analysis, stained with hematoxylin-eosin and pre-stained with carbon tetroxide, being observed as morphological and morphometric characteristics of the nerve fiber. The results were analyzed statistically as their normality and one-way ANOVA was performed, with LSD post-test. Regarding the euthanized animals on the eighth day, a sericin applied directly on the sciatic nerve lesion, presented proinflammatory characteristics, and an isolated swimming showed an improvement of hypernociception in relation to the other interventions. There were no signs of acceleration of the nerve repair process on the eighth day after injury. In relation to the euthanized animals on the 22nd day, an association of sericin and swimming treatment evidenced a regulating effect of the serinin pro-inflammatory action by the resisted swimming exercise, and an isolated sericin caused exacerbation of the inflammatory process and resistance swimming exercise, It showed good evolution to the nociceptive threshold and allodynia.

Key words: Biomaterials, Nerve compression, Exercises in the aquatic environment, Silk Protein.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	08
LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE ABREVIATURAS	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Sistema Nervoso Periférico	15
3.2 Nervo Isquiático	15
3.3 Lesões Nervosas Periféricas	17
3.3.1 Classificação das lesões nervosas periféricas	18
3.4 Reparo Nervoso	20
3.5 Exercício de natação como modalidade de tratamento na LNP	23
3.6 Proteína Sericina	25
3.6.1 Usos da proteína sericina	27
3.7 Uso de modelo animal	28
4 REFERÊNCIAS	29
5 ARTIGO CIENTÍFICO 1	40
6 ARTIGO CIENTÍFICO 2	63
7 ANEXOS	89
7.1 Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética	89
7.2 Anexo B - Normas da Revista	90
7.2.1 Normas de publicação da Revista Brasileira de Reumatologia (Artigo 01)	90

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Organização do nervo	16
Figura 02: Trajeto do nervo isquiático e local de origem	16
Figura 03: Trajeto esquemático do nervo isquiático em roedor	17
Figura 04: Tipos de lesão nervosa periférica conforme Seddon (1943)	19
Figura 05: Classificação das lesões proposta por Sunderland (1978)	19
Figura 06: Eventos do processo de regeneração nervosa periférica	21
Figura 07: Cronologia de eventos após lesão nervosa periférica	22
Figura 08: Imagem do casulo do bicho-da-seda	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Composição da proteína sericina.

26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

$^{\circ}\text{C}$ – Grau ou graus Celsius

® – Marca registrada

a. C. – Antes de Cristo

AEN – Área do nervo

AV – Avaliação

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

CEUA - Comitê de ética em uso animal

cm – Centímetro

cm^2 – Centímetro quadrado

CON – Grupo Controle

DAX – Diâmetro do axônio

DFN – Diâmetro da fibra nervosa

dr. – Doutor

dr.^a – Doutora

E - Experimental

EBM – Espessura da bainha de mielina

ERKs – Proteína quinase regulada por sinais extracelulares

fig. – Figura

g – Gramas

GAP-43 – Proteínas associadas ao crescimento neuronal

GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia

H/E – Hematoxilina e Eosina

IFC – Índice funcional do isquiático

IL-1 α – Interleucina 1 alfa

IL-6 – Interleucina 6

IT – Espalhar dos dedos intermediários

JNKs – quinase cJun N-Terminal

L – Litro ou litros

LABEF – Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional

LELRF – Laboratório de Estudos das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos

LES – Grupo lesão

LIF – Fator de inibição de leucócitos

LNP – Lesão Nervosa Periférica

LNPs – Lesões Nervosas Periféricas

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

mg – Miligramas

mg/Kg – Miligramas por quilo

ml – Mililitros

mm – Milímetros

n. – Número

N - Normal

NAT – Grupo lesionado tratado por natação

NF – Proteína de Neurofilamento

NGF – Fator de crescimento nervoso

p. – Página ou páginas

PL – Comprimento da pata

P.O. – Pós-operatório

PR – Paraná

Prof. – Professor

s – Segundo ou segundos

SER – Grupo lesionado tratado com sericina

SRNT – Grupo lesionado tratado com sericina e natação

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

Tab. – Tabela

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TOF – Distância entre uma pata e outra

TS – espalhar total dos dedos

Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

1 INTRODUÇÃO GERAL

Lesões no sistema nervoso periférico (SNP, doravante) são frequentes e implicam em alterações na função motora voluntária, levando a morbidades, incapacidades nas atividades de vida diária e laborais, ao déficit sensorial, dor crônica e à atrofia muscular. O tratamento, geralmente é longo, com consequente aumento dos custos para os sistemas de saúde públicos e previdenciário (HUANG et al., 2012; MIRANDA; TORRES, 2016; SIQUEIRA, 2007; SOUZA; KRAYCHETE, 2014). Além disso causam relevante impacto socioeconômico, pois a faixa etária de maior incidência é a de adultos jovens, entre 21 e 30 anos (SAADAT; ESLAMI; RAHIMI-MOVAGHAR, 2011).

Existem diversos tratamentos indicados nas lesões nervosas periféricas (LNPs) (SAVASTANO et al., 2014), como o repouso inicial, as terapias medicamentosas, as intervenções cirúrgicas e as não cirúrgicas (VALAT et al., 2010). No entanto, são observados diversos obstáculos nesse processo, tais como a reinserção nervosa inadequada e ineficiência da função nervosa, o que gera impacto direto no resultado final (HUANG et al., 2012; POSSAMAI; SIEPKO; ANDRÉ, 2010), e sustenta a necessidade de se investigar alternativas de tratamento.

Nesse sentido, o biopolímero proteico da seda sericina apresenta um potencial uso na biomedicina (ARAMWIT; SIRITIENTONG; SRICHANA, 2012; BARAJAS-GAMBOA et al., 2016; HASSIBA et al., 2016). Esta proteína é produzida quando a lagarta do bicho da seda da amoreira, *Bombyx mori*, expele o fio da seda na formação do seu casulo, constituído também pela proteína fibroína (KUNDU et al., 2008; MONDAL; TRIVEDY; NIRMAL-KUMAR, 2007).

Estas proteínas não existem de forma independente na natureza, sendo obtidas somente por meio da sericultura, atividade econômica que apresenta também um caráter social importante, pois é realizada em pequenas áreas rurais e se utiliza de mão de obra familiar (NAGARAJU; GOLDSMITH, 2002; SABAG; NICODEMO; OLIVEIRA, 2013). Na sericultura, a sericina é descartada em mananciais, o que impacta o ambiente. Diante disso, a sua utilização como biopolímero amplia a cadeia produtiva da seda, favorecendo o desenvolvimento sustentável (KOLEY; SAKURAI; AONO, 2016; SAROVART et al., 2003).

Nos últimos anos, os efeitos da sericina vêm sendo estudados com diversas finalidades, porém destaca-se sua potencial aplicação na indústria médica e farmacêutica, visto que existem resultados positivos, como a melhora do processo de cicatrização e, conseqüente diminuição dos níveis de mediadores inflamatórios (ARAMWIT et al., 2009; PADOL et al., 2012), a influência na redução da obesidade em modelos experimentais (KEAWLORN et al., 2013; SEO et al., 2011), a diminuição dos níveis sanguíneos de colesterol (LIMPEANCHOB et al., 2010), a inibição da proliferação de células de carcinoma do colo em humanos (WARAPORN et al., 2012), a regeneração de tecido cartilaginoso (DINESCU et al., 2013), a aceleração da regeneração em lesões oftálmicas (EIDET et al., 2016; NAGAI; YOSHIMASA, 2013), a redução na evolução de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (ZHAORIGETU; SASAKI; KATO, 2007). Além disso, são verificados também possibilidades de uso em nível industrial nos ramos alimentícios e em cosmetologia (BYUN et al., 2009; PATEL; MODASIYA, 2011; RAJPUT; KUMAR, 2015).

A possibilidade de utilização da sericina no tratamento de lesão nervosa periférica (LNP) se apresenta bastante promissor e, o uso combinado com terapias que já se revelaram eficazes, como no caso do exercício físico, que potencializa a terapêutica. Nesse sentido, estudos de lesão experimental em ratos, têm mostrado a eficiência do exercício físico na melhora funcional isquiática (JANG; LEE, 2015), no aumento de fatores de crescimento neuronais (DISHMAN et al., 2006), e na aceleração do processo de regeneração nervosa (TEODORI et al., 2011).

Dessa maneira, devido ao fato das LNPs afetarem uma parcela considerável da população economicamente ativa, trazendo prejuízos sociais e econômicos, e devido à carência de estudos que analisem o efeito da sericina e de sua associação com o exercício de natação na recuperação do nervo isquiático, justifica-se a abordagem deste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Analisar os efeitos do tratamento com a proteína sericina associada ao exercício de natação, com sobrecarga, sobre o reparo do nervo isquiático após compressão, em ratos *Wistar*.

2.2 Objetivos específicos:

- Verificar a nocicepção de ratos *Wistar* submetidos ao modelo experimental de compressão nervosa, tratados com a proteína sericina associada ou não a protocolo de exercício por natação;
- Avaliar a funcionalidade do nervo isquiático;
- Comparar com base em análise morfométrica e morfológica, o processo de reparo nervoso entre os diferentes tratamentos e períodos propostos.

3 REVISÃO GERAL DE LITERATURA

3.1 Sistema Nervoso Periférico

O SNP é composto por terminações nervosas, gânglios e nervos, sendo os últimos, cordões esbranquiçados formados por fibras nervosas, classificadas conforme a estrutura que inervam em componentes funcionais sensitivos ou motores (DÂNGELO; FATTINI, 2002; ZILIC et al., 2015). A unidade funcional do nervo periférico é a fibra nervosa, recoberta pela bainha de mielina e essa pelo neurolema, sendo a bainha de mielina descontínua nos nodos de Ranvier, o qual ocorre a facilitação da transmissão do impulso nervoso (GRAÇA, 1988; SIQUEIRA, 2007).

Envolvendo o nervo na camada externa existe uma bainha de tecido conjuntivo denso, o epineuro (CATTELAN et al., 1997), no qual as fibras de colágeno se alinham de forma a impedir lesões por distensão excessiva do feixe nervoso. Originam-se desse envelopamento externo fibras de tecido conjuntivo, o perineuro, uma bainha relativamente fina, densa e distinta (GARTNER; HIATT, 2003), que envolve aglomerados de fibras nervosas, os fascículos (CATTELAN et al., 1997). No interior dos fascículos, cada fibra nervosa é individualmente envolvida por uma camada de tecido conjuntivo frouxo, o endoneuro, formando uma delicada e fina bainha externa de fibras reticulares (fig. 01) (CATTELAN et al., 1997; GARTNER; HIATT, 2003).

A excitabilidade das células do SNP se dá pela existência de potenciais elétricos que passam através das membranas neuronais. Quando um estímulo químico, elétrico ou mecânico é feito sobre a membrana neuronal, ocorre a mudança do potencial de membrana, e se for de intensidade suficiente gera um potencial de ação, transmitindo esse impulso pela fibra nervosa por uma sequência de despolarizações (DURÁN, 2003; GUYTON, 2006).

3.2 Nervo Isquiático

O nervo isquiático é o maior do corpo humano (ARCOS et al., 2009; FONSECA et al., 2002), formado pela continuação do fascículo superior do plexo lombo-sacral, originário das raízes nervosas ventrais entre a quarta vértebra lombar e a terceira vértebra sacral, com cerca de 2 cm de largura na região proximal, em que atravessa a pelve pelo forame isquiático maior (fig. 02) (FONSECA et al., 2002), e emerge na região glútea, em geral inferior à margem do músculo piriforme, podendo raramente emergir em dois ramos, com sua porção fibular comum por meio do músculo piriforme e a porção tibial acompanha inferiormente a margem do mesmo músculo (VICENTE et al., 2007). Mantendo um trajeto descendente, transita entre o túber isquiático e o trocânter maior do fêmur, mais próximo da primeira saliência óssea, anterior aos músculos bíceps femoral e semitendíneo, até se dividir em nervo tibial e nervo fibular comum, normalmente, na fossa poplítea (FONSECA et al., 2002; VICENTE et al., 2007).

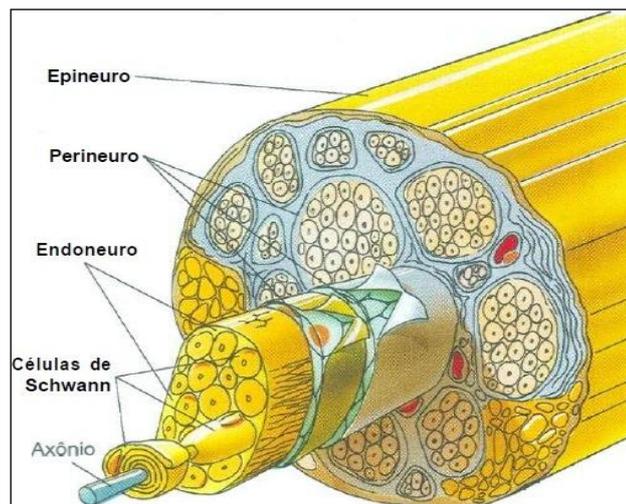


Figura 01 – Ilustração esquemática da organização do nervo, evidenciando as bainhas conjuntivas.
Fonte: GARTNER; HIATT, 2003.

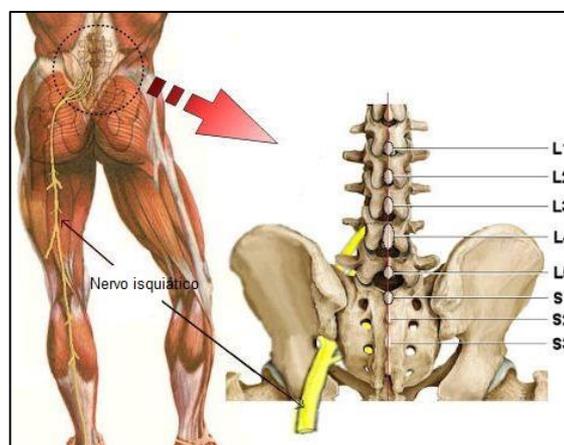


Figura 02 – Ilustração mostrando o trajeto do nervo isquiático. Disponível em: <<http://www.mdsaude.com/2013/11/nervo-ciatico.html>>. Acesso em: 24 jun. 2015.

Existem diversos estudos que se utilizam do modelo experimental com ratos, e atualmente é parte inevitável da pesquisa biomédica, reconhecido como modelo proeminente (SENGUPTA, 2013), sendo que na investigação de nervos periféricos, o nervo isquiático apresenta certa popularidade, provavelmente resultado da fácil acessibilidade cirúrgica (fig. 03) e por estar bem caracterizado por estudos que investigam condições diversas relacionadas a estes modelos experimentais (SAVASTANO et al., 2014). Nesses modelos é importante descrever a anatomia macroscópica do nervo isquiático, que é similar à observada em humanos, respondendo a estímulos de forma semelhante (SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013; YAN et al., 2010).

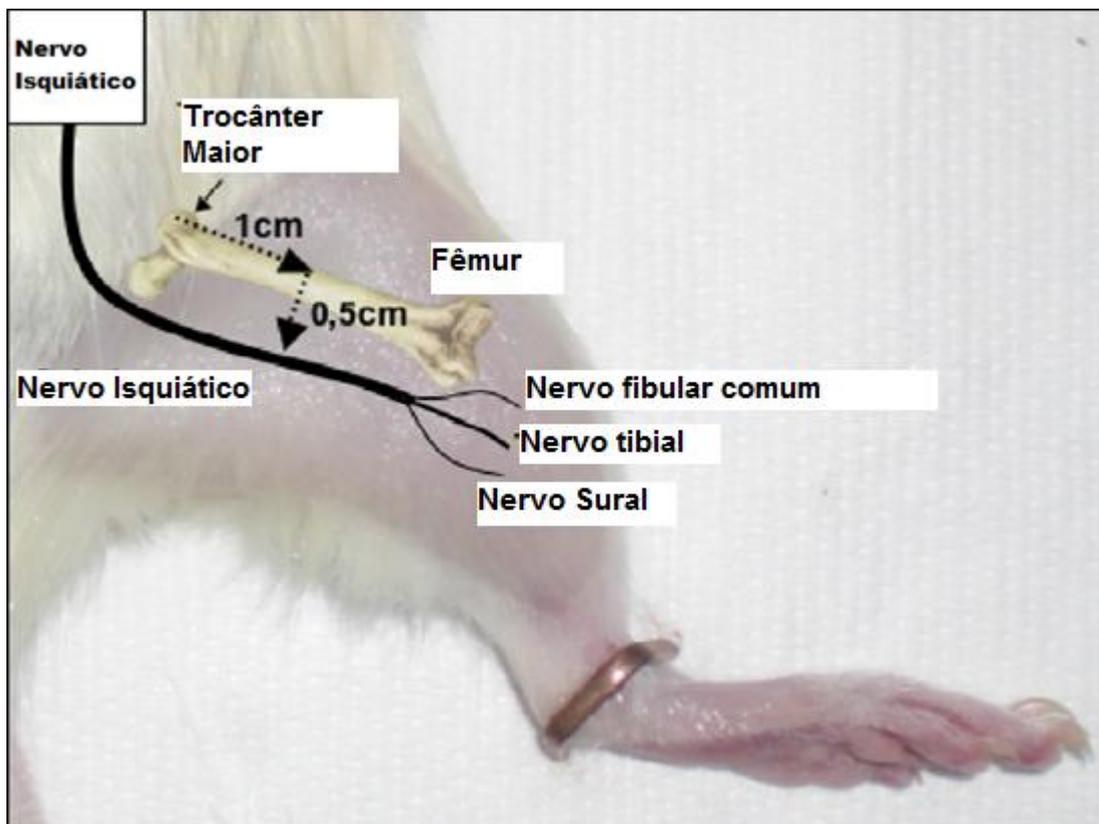


Figura 03 – Ilustração esquemática do trajeto do nervo isquiático em modelo de rato Wistar, posicionado em decúbito ventral. Fonte: adaptado de SAVASTANO et al., 2014.

3.3 Lesões Nervosas Periféricas

Devido à localização periférica, os nervos estão susceptíveis a lesões decorrentes de traumatismos abertos ou fechados, como compressão, tração, avulsão, descontinuação e por limitação de aporte sanguíneo. A ocorrência dessas

lesões pode estar associada a gênero, a hábitos de vida, à idade, à ocupação, a fatores genéticos e ambientais; todavia, independentemente da causa, sempre interfere na transmissão dos impulsos nervosos e prejudica sua função (BRULL et al., 2015; CANNONI et al., 2012; DANEYEMEZ; SOLMAZ; IZCI, 2005; NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007; STAFFORD; PENG; HILL, 2007; SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013).

Historicamente, LNPs são tema de investigação quanto à sua anatomia e fisiopatologia. Galeno foi o primeiro a distinguir nervos de tendões no século II. No entanto, os grandes avanços clínicos na área, estão relacionados a tempos de guerra, tanto com relação a descrições anatômicas, quanto aos sintomas e aos procedimentos cirúrgicos para correção (SIQUEIRA, 2007).

Os fatores etiológicos e epidemiológicos da LNP variam conforme períodos de conflito e desenvolvimento populacional, porém caracterizados por déficits significativos de função (ESER et al., 2009; STAFFORD; PENG; HILL, 2007). A incidência estimada de LNP na população, causada por lesão traumática, está entre 2% e 2,8%, contudo se forem consideradas as lesões de plexo e raízes nervosas, o índice sobe para 5% (TAYLOR et al., 2008). O acometimento está relacionado principalmente à população economicamente ativa, já que a maior incidência ocorre na faixa etária entre 21 e 35 anos (cerca de 59%), e a grande maioria acometida neste grupo é do sexo masculino (83%) (TAYLOR et al., 2008; SAADAT; ESLAMI; RAHIMI-MOVAGHAR, 2011).

3.3.1 Classificação das lesões nervosas periféricas

As LNPs são classificadas conforme a intensidade do comprometimento da estrutura nervosa e as limitações funcionais decorrentes da lesão. Em 1943, Seddon propôs três graus de comprometimento (fig. 04), sendo eles a neuropraxia, a axonotmese e a neurotmeese. Em 1978, Sunderland subdividiu a axonotmese em três graus (fig. 5), reclassificando-as em cinco graus de lesão (SIQUEIRA, 2007).

A neuropraxia ou lesão de primeiro grau é a mais leve e decorrente da interrupção da transmissão do impulso nervoso no ponto lesionado, geralmente devido a uma compressão. A estrutura macroscópica do nervo apresenta

continuidade e o bloqueio da condutibilidade nervosa é reversível, não apresentando degeneração Walleriana. Na axonotmese, ou lesão de segundo grau, o epineuro e o perineuro ficam preservados porém, ocorre a descontinuidade completa do axônio e mielina, levando à degeneração Walleriana distal do foco lesionado. A neurotmese é a lesão mais grave, ocorrendo a descontinuação nervosa completa, com perda funcional extensa e prognóstico ruim, necessitando de intervenção cirúrgica (MADURA, 2012; MINAMOTO, 2007).

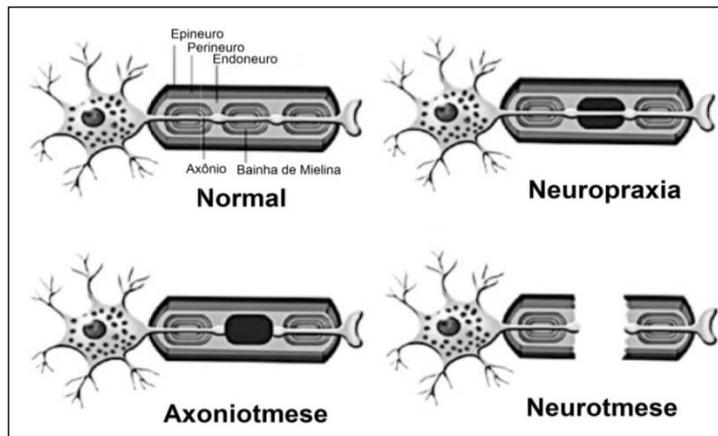


Figura 04 – Ilustração esquemática dos tipos de lesão nervosa periférica de acordo com Seddon (1943). Fonte: MARTINS et al., 2013.

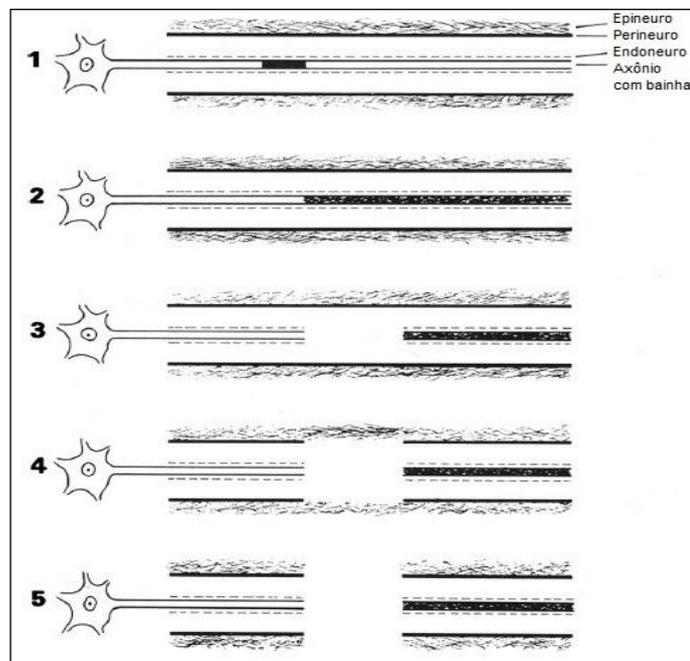


Figura 05 – Classificação das lesões proposta por Sunderland (1978), sendo que: 1 - refere-se ao bloqueio da condutibilidade nervosa, com estrutura macroscópica do nervo preservada; 2 - ocorre lesão do axônio; 3 - lesão do axônio e endoneuro; 4 - lesão do axônio, endoneuro e perineuro; 5 - lesão completa do nervo, sendo axônio, endoneuro, perineuro e epineuro lesionados. Fonte: CAMPBELL, 2008.

A axonotmese tem seus graus de comprometimento constituindo sua classificação em segundo, terceiro e quarto graus, dependendo do envolvimento do endoneuro, perineuro e epineuro (MINAMOTO, 2007). Na lesão de grau dois, existe a ruptura do axônio, na de grau três além do axônio, sua bainha endoneural também é lesionada, já no grau quatro, a lesão ocorre com ruptura dos fascículos, mantida a continuidade somente pelo tecido epineural (CAMPBELL, 2008).

3.4 Reparo Nervoso

A lesão nervosa no humano, tipo axonotmese, apresenta o rompimento de axônios, o que leva a um processo denominado degeneração Walleriana, não obstante, esse ocorre somente no sentido distal à lesão. Nos axônios do coto proximal a degeneração axônica estaciona no primeiro nodo de Ranvier proximal ao local da lesão, age de forma similar a uma porta corta fogo e impede que prossiga no coto proximal, o que permite deixar o ambiente propício para que ocorra a regeneração axonal (fig. 06). Já no coto distal, o processo de degeneração Walleriana ocorre em todas as estruturas das fibras nervosas em um espaço de tempo de cerca de dois a três dias (BELKAS; SHOICHET; MIDHA, 2004; CAMPBELL, 2008; NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007; SIQUEIRA, 2007), sendo que a cascata de eventos disparada a partir da lesão envolve, entre outros fatores, a migração de macrófagos para a lesão, a proliferação de células de Schwann, mudanças nos constituintes da matriz extracelular e a reorganização do espaço endoneural, a produção de citocinas e o aumento de neurotrofinas (BELKAS; SHOICHET; MIDHA, 2004; DUBOVÝ, 2011).

A cascata de eventos degenerativos inicia imediatamente após a lesão, sendo que ocorre influxo de cálcio, para as células de Schwann, resultantes da agressão mecânica e pela interrupção do fluxo sanguíneo e, conseqüente, diminuição do aporte de oxigênio. O cálcio, além de estimular o início da proliferação das células de Schwann, ativa a calpaína, que é uma protease essencial para a degeneração axonal. Uma concentração adequada de cálcio pode ser essencial para a regeneração nervosa, já que pode aumentar o crescimento axonal (SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013).

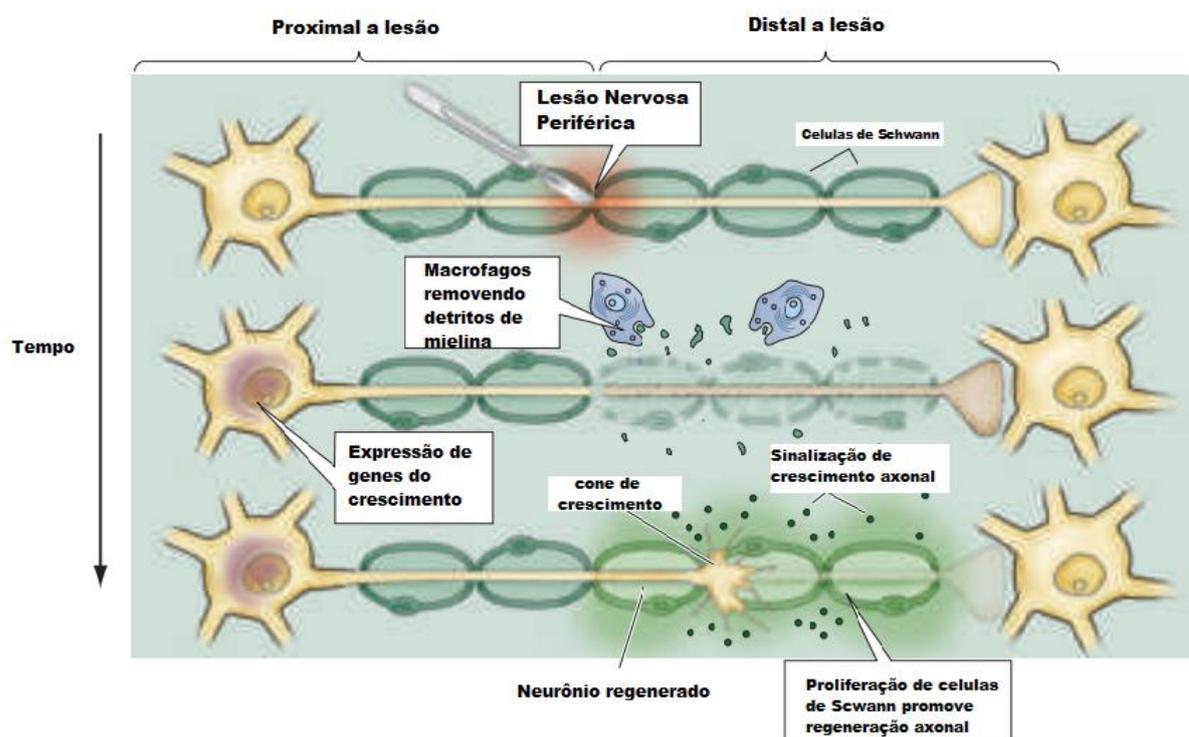


Figura 06 – Ilustração esquemática do momento da lesão nervosa periférica e em sequência a remoção de restos mielínicos por macrófagos e proliferação de células de Schwann, distal a lesão, durante o processo de regeneração. Fonte: Purves et al., 2004.

Uma vez iniciado o processo de influxo de cálcio induzido pela LNP, ativa-se uma sequência de eventos intracelulares e de proteínas reguladoras de genes, como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que abrange grande número de proteínas, dentre elas a proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERKs) e quinase c-Jun N-Terminal (JNKs) (SILVA et al., 2009), que já estão ativadas cerca de 20 minutos após a lesão. Porém a ativação da proteína p38 da MAPK, que é uma das moléculas de importância para a progressão da degeneração Walleriana, aparece somente cerca de seis horas mais tarde (fig. 07) (SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013).

O fator de transcrição da JNKs é um regulador global de resposta às células de Schwann, sendo essencial sua ativação para a formação das bandas de Büngner e para a proliferação das células de Schwann, tendo importância a rápida ativação de ERKs que são pré-requisitos para proliferação de células de Schwann, que atingem seu máximo de dois a três dias após a lesão, tendo importância para o crescimento axonal (SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013).

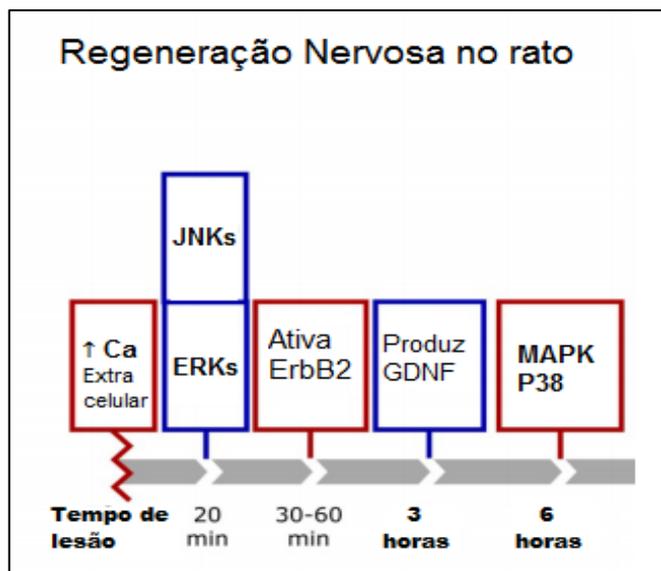


Figura 07 – Cronologia de alguns eventos após lesão nervosa periférica em ratos, importantes para a regeneração nervosa. Fonte: adaptado de SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013.

Uma regeneração axonal periférica no humano, para que seja bem-sucedida, depende de um processo de resposta inflamatória rápida e eficiente. O pico dessa resposta acontece de quatro a sete dias após a lesão, o mesmo tempo que a barreira sanguínea do nervo torna-se mais permeável, facilitando a migração celular e a reparação nervosa (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007; SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6), fator de inibição de leucócitos (LIF) e interleucina 1alfa (IL-1 α). Em modelos de roedores, inicia de três a cinco horas após a lesão, e o pico no número de macrófagos, tanto endógenos quanto os sistêmicos, ocorre após uma semana da lesão. A inflamação é vital para a regeneração nervosa, visto que as células mais envolvidas no processo de degeneração Walleriana, as células de Schwann e os macrófagos, comunicam-se por meio de redes de citocinas, controlando a fagocitose e fatores de crescimento durante a regeneração, sendo que atrasos nesse processo podem levar à perda da capacidade regenerativa (SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013).

Os macrófagos, presentes no coto distal, fazem a remoção dos restos mielínicos em degeneração, entre o segundo e o sétimo dia após a lesão, durante o processo de regeneração, sendo que devido à extrusão inicial da bainha de mielina, no máximo em três dias após a lesão do axônio, se inicia a divisão e proliferação das células de Schwann associada à produção de substâncias quimiotáticas, que irão se alinhar ao longo da lâmina basal, formando as bandas de Büngner, auxiliando na

orientação do crescimento axonal. Além disso, as células de Schwann também realizam fagocitose (SIQUEIRA, 2007; SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013).

O crescimento axonal acontece pelos brotos axonais, que são prolongamentos ricos em mitocôndrias e componentes do citoesqueleto, que surgem no coto proximal e atravessam o segmento lesionado por meio das bandas de Büngner, e se dirigem aos órgãos alvo sob influência de fatores neurotróficos, quimiocinas e proteínas de adesão celular produzidas no local da lesão (MADURA, 2012; RUITER et al., 2014). Alguns fatores influenciam esse crescimento, como o fator de crescimento nervoso (NGF), o fator de neurotrofinas derivado do encéfalo (BDNF), e as proteínas associadas ao crescimento neuronal (GAP-43). Esses brotamentos crescem a partir do coto proximal na velocidade aproximada de 0,2 a 1 milímetros por dia (AL-MAJED et al., 2000; STA et al., 2014) podendo variar em experimentos com animais ou pelas condições apresentadas no local da lesão (SIQUEIRA, 2007).

Em modelos experimentais, a remielinização se inicia após o oitavo dia com o axônio já regenerado, inicialmente envolvido por células de Schwann e seus tubos endoneurais, que se enrolam para formar a mielina, sendo a determinação do axônio como mielínico ou não, relacionada à sua própria estrutura. Existe um bom prognóstico funcional quando a conexão do axônio, durante a regeneração, ocorre com seus alvos originais, podendo formar novas terminações nervosas funcionais, levando a um melhor desempenho (SIQUEIRA, 2007), porém depende da extensão da lesão e da localização dos alvos da inervação, o que é difícil de prever (MADURA, 2012; YU et al., 2015).

3.5 Exercício de natação como modalidade de tratamento na LNP

Dentre os tratamentos relacionados à lesão nervosa periférica, exercícios físicos estão entre as opções mais indicadas, pois indivíduos submetidos a esse tratamento apresentam maior eficácia na prevenção de episódios de dor, diferente de outras abordagens ortopédicas utilizadas que apresentam menor resolutividade preventiva. Todavia, as razões da eficácia do exercício são ainda foco de estudo pelas evidências não serem claras, contudo alguns benefícios globais

como o aumento de força, a resistência e a mobilidade parecem estar presentes (BIGOS et al., 2009; NIJ et al., 2012).

O exercício aeróbico de natação, entre as modalidades de exercícios físicos, apresenta bom prognóstico, revelando efeito no sistema cardiovascular (BARROS et al., 2011; CHINKIN, 2013; MEDEIROS et al., 2004; RITTER et al., 2012; SILVA et al., 2011), podendo até mesmo auxiliar no controle e na redução dos níveis glicêmicos sanguíneos (OLIVEIRA; DOURADO; CESAR, 2013), promovendo alterações no uso de substrato energético (FREITAS et al., 2010), e a possibilidade de periodizar o treinamento dentro da fisiologia experimental, realizado de maneira similar ao que se aplica em humanos (ARAUJO et al., 2010).

Alguns estudos de lesão experimental em ratos têm mostrado que o exercício físico é eficiente na recuperação funcional após lesão do nervo isquiático, abordando diferentes aspectos da recuperação funcional (JANG; LEE, 2015; KOLTYN, 2000; POSSAMAI; SIEPKO; ANDRÉ, 2010; TEODORI et al., 2011). Além disso, apresenta redução de citocinas pró-inflamatórias no músculo esquelético de ratos idosos (AMADIO et al., 2015). Ainda, a natação aplicada nas fases agudas e tardias em modelos de axonotmese mostra aceleração no processo de regeneração do nervo isquiático (TEODORI et al., 2011), além de estimular o crescimento e desenvolvimento de novas células e aumentar a presença de fatores de crescimento neuronais (DISHMAN et al., 2006).

Apesar de observadas vantagens relacionadas aos exercícios aeróbicos, indicando o aumento do limiar de dor relacionado ao aumento da intensidade, não existe consenso entre as correlações de intensidade durante o exercício (KOLTYN, 2002; NIJ et al., 2012), sendo que a determinação adequada de esforço imposto, tem influência direta nos resultados (GOBATTO et al., 2008).

Ao mesmo tempo em que diversos estudos enfatizam a necessidade de novas premissas relacionadas à prática terapêutica e a experimentos mais aprofundados, voltados ao esclarecimento e ao desenvolvimento de parâmetros de referência quanto ao exercício aeróbico (KOLTYN, 2000; NIJ et al., 2012; TEODORI et al., 2011), novas alternativas vêm sendo investigadas visando suplementar a prática já existente, como a associação da aplicação de laser com a proteína do látex no processo de regeneração nervosa periférica (DIAS et al., 2013), mostrando possibilidades do uso associado de biomateriais, como a proteína da seda sericina.

3.6 Proteína Sericina

A sericina é um biopolímero proteico obtido a partir do casulo da *Bombyx mori* (fig. 08), ou bicho da seda, como é popularmente conhecido. A constituição do casulo ocorre por três proteínas, a saber: a fibroína, a qual compõe a maior parte da composição do fio de seda têxtil; a sericina, que tem cerca de 20 a 30% de participação na constituição do casulo e tem como principal função dar adesão na conformação da mesma, e por fim, a P25, sendo essa uma glicoproteína que auxilia na manutenção da continuidade do fio, porém aparece em pequenas concentrações (ARAMWIT; SIRITIENTONG; SRICHANA, 2012; PADAMWAR et al., 2005).

Em sua composição, a sericina é formada por diversos aminoácidos (Tab. 01) (BARAJAS-GAMBOA et al., 2016; ZHANG et al., 2006) e apresenta, em grande parte de sua composição, serina e ácido aspártico, que propicia caráter hidrofílico (BARAJAS-GAMBOA et al., 2016; KUNDU et al., 2008).

O processo que separa a sericina da fibroína, denominado degomagem, é possível devido à composição proteica da sericina apresentar predominância de aminoácidos polares, o que possibilita a remoção quando aquecidos em água, visto que apresenta solubilidade (BARAJAS-GAMBOA et al., 2016; ZHANG et al., 2006).



Figura 08 – Imagem do casulo do bicho-da-seda em construção, e finalizado, bem como da lagarta da seda e a folha de amoreira. Fonte: Arquivo de imagens do LABEF.

Tabela 01 – Composição da proteína sericina.

Aminoácidos	% mol na Sericina
Serina	25,28
Ácido aspártico	20,57
Glicina	10,51
Treonina	7,96
Ácido glutâmico	7,90
Arginina	5,26
Lisina	4,68
Tirosina	4,47
Alanina	3,97
Valina	3,79
Histidina	1,75
Leucina	1,36
Fenilalanina	0,96
Isoleucina	0,88
Cisteína	0,72

Fonte: adaptado de (Zhang et al., 2006).

A sericicultura é uma das mais antigas atividades agroindustriais conhecidas e teve origem na China, provavelmente no período neolítico, na província de Shanxi, em uma região arqueológica, datada entre 2600-2300 a.C., contudo, os resíduos mais antigos de seda datam da dinastia Shang, entre os séculos 16 e 13 a.C. A invenção da seda é, tradicionalmente, atribuída à esposa do Imperador Amarelo, que se acredita ter vivido entre 1698 e 1598 a.C. Conforme relatos de Confúcio, enquanto a imperatriz bebia uma xícara de chá sob uma amoreira, um casulo de seda caiu dentro de sua xícara e, sobre influência do calor da bebida, o fio da seda desenrolou e, assim, possibilitou a descoberta do processo para confecção dos tecidos de seda (PAPAVERO; PUJOL-LUZ, 2011).

O início da sericicultura no Brasil data do começo do século XIX, e está relacionado à vinda de Dom João VI, com a importação de algumas amoreiras e seu plantio junto ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro (OKAMOTO, FURLANETO, MARTINS, 2013). Porém, seu maior desenvolvimento se deu com a fundação da Companhia Seropédica Fluminense por José Pereira Tavares, sendo o sócio majoritário D. Pedro II que, posteriormente, passou a denominá-la Imperial Companhia Seropédica Fluminense, se expandindo nos anos seguintes

principalmente para os estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (PORTO, 2014).

Segundo dados publicados pela Secretaria de Agricultura e abastecimento do Paraná, referentes à safra de 2010, o Brasil ocupa a sexta posição no ranking mundial de produtores de seda, sendo a China o maior produtor, seguida da Índia, e nas 3ª, 4ª e 5ª posições respectivamente, aparecem Vietnã, Uzbequistão e Tailândia. Do total produzido no Brasil, cerca de 90% do cultivo e produção de *B. mori* é realizada no estado do Paraná (BUSCH, 2010).

3.6.1 Usos da proteína sericina

A sericina tem uso potencial em uma grande variedade de aplicações, tanto no campo comercial quanto na área experimental, sendo diversas pesquisas desenvolvidas no intuito de utilizá-la como matéria-prima em diferentes abordagens. Ademais, mostra ampla ação em locais e substâncias distintas, por exemplo, na inibição de atividade bacteriana, gerando a possibilidade de utilizar a sericina como revestimento em superfícies de fibras naturais e artificiais, assim como a usada em filtros de ar ou outros materiais similares, como fraldas e curativos (ARAMWIT; SIRITIENTONG; SRICHANA, 2012; BARAJAS-GAMBOA et al., 2016; RAJPUT; KUMAR, 2015; SAROVART et al., 2003; SIRITIENTONG et al., 2016).

Na indústria biomédica, pesquisas sugerem que a sericina tem ação na redução da evolução de doenças relacionadas ao estresse oxidativo em ratos (ZHAORIGETU; SASAKI; KATO, 2007), como potencializador no cultivo embrionário bovino (ISOBE et al., 2015), influência da proteína sericina na dieta e obesidade em ratos (KEAWLORN et al., 2013; SEO et al., 2011), apresenta propriedades anti-leishmaniose (KUMAR, 2015), na diminuição de colesterol em níveis sanguíneos (LIMPEANCHOB et al., 2010), efeito protetor na gastrite (LI et al., 2008a) e no tratamento hepático, prevenindo a deterioração de lipídios estruturais na lesão induzida pelo álcool em camundongos (LI et al., 2008b). Ainda oferece resultados positivos evitando a proliferação de células de carcinoma de colo de útero em humanos (WARAPORN et al., 2012), propicia o aumento da absorção intestinal de zinco, ferro, magnésio e cálcio em ratos (SASAKI; YAMADA; KATO, 2000), também

apresenta efeito hipotensor e vasorrelaxante, sugerindo a possibilidade do uso terapêutico da sericina como modulador vascular (ONSA-ARD et al., 2013).

Alguns autores relatam ação no processo de cicatrização, levando a menores níveis de mediadores inflamatórios (ARAMWIT et al., 2009; PADOL et al., 2012), influência na regeneração de tecido cartilaginoso, favorecendo a proliferação de novas células (DINESCU et al., 2013), e também eficaz em acelerar a regeneração de tecido cutâneo (ARAMWIT et al., 2013; ERSEL et al., 2016), em lesões relacionadas a doenças sistêmicas em ratos (NAGAI; YOSHOMASA, 2013) e no reparo neuronal, tendo efeito neuroprotetor como biomaterial, realizando conexão eficaz para o crescimento de neurônios in vitro (WANG et al., 2015). Além desses resultados, outros potenciais efeitos estão sendo estudados, o que torna a sericina, foco de interesse em diversos segmentos no intuito de delimitar as possibilidades de abordagem relacionadas ao seu uso.

3.7 Uso de modelo animal

A necessidade de buscar alternativas terapêuticas, como a sericina, ou mesmo aprimorar tratamentos já utilizados na prática clínica, como exercícios aeróbicos, revelam a necessidade de testes em modelos vivos, sendo assim, o uso de modelo experimental animal permite um alto controle de variáveis, melhorando a confiabilidade da pesquisa, pois permite a periodização de treino aplicado de forma similar ao usado em humanos, o que provê uma forma de elucidar questões associadas aos métodos propostos devido ao controle do ambiente e a possibilidade de intervenções invasivas nesses animais (ARAUJO et al., 2010).

A análise do SNP em modelos animais, em geral envolve lesão cirúrgica controlada, o que possibilita a análise de intensidade da condição neuropatológica e viabiliza o uso de métodos de intervenção para o desenvolvimento da hipótese do experimento, por exemplo, a ativação mecânica voluntária como indicativo da existência de células intactas no trajeto nervoso, sugerindo a presença de reparo em algum nível da lesão (BOADA et al., 2015; SAVASTANO et al., 2014), e mesmo feita a investigação em roedores, é provável que se aplique de forma similar em todos os mamíferos (NASCIMENTO et al., 2015; SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013).

4 REFERÊNCIAS

AMADIO, E. M.; SERRA, A. J. GUARALDO, S. A.; SILVA JR, J. A.; ANTÔNIO, E. L.; SILVA, F.; PORTES, L. A.; TUCCI, P. J. F.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; CARVALHO, P. T. C. The action of pre-exercise low-level laser therapy (LLLTL) on the expression. Of IL-6 and TNF- α proteins and on the functional fitness of elderly rats subjected to aerobic training. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 1, p. 1127-1134, 2015.

AL-MAJED, A. A.; NEUMANN, C. M.; BRUSHART, T. M., GORDON, T. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 7, p. 2602-2608, 2000.

ARAMWIT, P.; KANOKPANONT, S.; DE-EKNAMKUL W.; SRICHANA, T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 5, p. 556-561, 2009.

ARAMWIT, P.; PALAPINYO, S.; SRICHANA, T.; CHOTTANAPUND, S.; MUANGMAN, P. Silk sericina ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. **Archives of Dermatological Research**, v. 305, n. 1, p. 585-594, 2013.

ARAMWIT, P.; SIRITIENTONG, T.; SRICHANA, T. Potential applications of silk sericina, a natural protein from textile industry by-products. **Waste Management & Research**, v. 30, n. 3, p. 217-224, 2012.

ARAÚJO, G. G.; PAPOTI, M.; MANCHADO-GOBATTO, F. B.; MELLO, M. A. R.; GOBATTO, C. A. Padronização de um protocolo experimental de treinamento periodizado em natação utilizando ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 1, p. 51-56, 2010.

ARCOS, A. W. V.; PAULA, R. C.; MEDEIROS, R. B.; PAULA, R. C. Variações anatômicas do nervo isquiático e suas relações com a síndrome do piriforme. **Acta Scientiae Medica_On line**, v. 2, n. 2, p. 71-75, 2009.

BARAJAS-GAMBOA, J. A.; SERPA-GUERRA, A. M.; RESTREPO-OSORIO, A.; ÁLVAREZ-LÓPEZ, C. Sericin applications: a globular silk protein. **Ingeniería y Competitividad**, v. 18, n.2 p. 193-206, 2016.

BARROS, J. G.; REDONDO, F. R.; ZAMO, F. S.; MATTOS, K. C.; ANGELIS, K. D.; IRIGOYEN, M. C.; OLIVEIRA, E. M. Treinamento físico de natação promove remodelamento cardíaco e melhora a perfusão sanguínea no músculo cardíaco de SHR via mecanismo dependente de adenosina. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 3, p. 193-197, 2011.

BELKAS, J. S.; SHOICHET, M. S.; MIDHA, R. Axonal guidance channels in peripheral nerve regeneration. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 14, n. 3, p. 190-198, 2004.

BIGOS, S. J.; HOLAND, J.; HOLLAND, C.; WEBSTER, J. S.; BATTIE, M.; MALMGREN, J. A. high-quality controlled trials on preventing episodes of back problems: systematic literature review in working-age adults. **Spine Journal**, v. 9, n. 2, p. 147-168, 2009.

BOADA, M. D.; GUTIERREZ, S.; ASCHENBRENNER, C. A.; HOULE, T. T.; HAYASHIDA, K.; RIRIE, D. G.; EISENACH, J. C. Nerve injury induces a new profile of tactile and mechanical nociceptor input from undamaged peripheral afferents. **Journal of Neurophysiology**, v. 113, n. 1, p. 100-109, 2015.

BRULL, R.; HADZIC, A., REINA, M. A.; BARRINGTON, M. J. Pathophysiology and etiology of nerve injury following peripheral nerve blockade. **Regional anesthesia and Pain Medicine**, v. 40, n. 5, p. 479-490, 2015.

BUSCH, A. P. B. Sericicultura. **Secretaria de Agricultura e do Abastecimento do Paraná**. Análise da conjuntura agropecuária – safra 2010/2011. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/seda_2010_11.pdf>. Acesso em: 28 de jun. 2015.

BYUN, E.B.; SUNG, N. Y.; KWON, S. K.; SONG, B. S.; KIM, J. H.; CHOI, J. I.; HWANG, H. J.; BYUN, M. W. LEE, J. W. In vitro and in vivo studies on the cytotoxicity of irradiated silk fibroin against mouse melanoma tumor cell. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 429-431, 2009.

CANNONI, L. F.; HADDAD, L.; SAADE, N.; COSTA, M. A. T.; VEIGA, J. C. E. Lesões traumáticas de nervos cranianos. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**, v. 31, n. 4, p. 184-194, 2012.

CAMPBELL, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clinical neurophysiology**, v. 119, n. 9, p. 1951-1965, 2008.

CATTELLAN, J. W.; BLAZQUEZ, F. J. H.; FERREIRA, N.; SOARES, M. A. M. Características histológicas de nervos espinhais de mamíferos. **Veterinária Notícias**, v. 3, n. 1, p. 151-157, 1997.

CHIMKIN, A. S. The effects of various swimming training protocols on cardiac capacity and ventricular fibrillation threshold in rats. **Central European Journal of Sport Sciences and Medicine**, v. 2, n. 2, p. 9-14, 2013.

DANEYEMEZ, M.; SOLMAZ, I.; IZCI, Y. Prognostic factors for the surgical management of peripheral nerve lesions. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 1, p. 269-275, 2005.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.

DIAS, F. J.; ISSA, J. P. M.; COUTINHO-NETTO, J.; FAZAN, V. P. S.; SOUSA, L. G.; IYOMASA, M. M.; PAPA, P. C.; WATANABE, I. Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy protein (Hevea brasiliensis) administration following a crush injury of the sciatic nerve in rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v.349, n. 2015, p. 129-137, 2015.

DINESCU, S.; GALATEANU, B.; ALBU, M.; LUNGU, A.; RADU, E.; HERMENEAN, A.; COSTACHE, M. Biocompatibility assessment of novel collagen-sericin scaffolds improved with hyaluronic acid and chondroitin sulfate for cartilage regeneration. **Hindawi Publishing Corporation – Biomed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 1-11, 2013.

DISHMAN, R. K.; BERTHOUD, H.; BOOTH, F. W.; COTMAN, C. W.; EDGERTON, V. R.; FLESHNER, M. R.; GANDEVIA, S. C.; GOMEZ-PINILLA, F.; GREENWOOD, B. N.; HILLMAN, C. H.; KRAMER, A. F.; LEVIN, B. E.; MORAN, T. H.; RUSSO-NEUSTADT, A. A.; SALAMONE, J. D.; HOOMISSEN, J. D. V.; WADE, C. E.; YORK, D. A.; ZIGMOND, M. J. Neurobiology of Exercise. **Obesity**, v. 14, n. 3, p. 345-356, 2006.

DUBOVÝ, P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. **Annals of Anatomy**, v. 193, n. 4, p. 267-275, 2011.

DURÁN, J. E. R. **Biofísica – Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Prentice Hall, 2003.

EIDET, J. R.; REPPE, S.; PASOVIC, L.; OLSTAD, O. K.; LYBERG, T.; KHAN, A. Z.; FOSTAD, I. G.; CHEN, D. F.; UTHEIM, T. P. The silk-protein sericina induces rapid melanization of cultured primary human retinal pignemt epithelial cells by activating the NF-KB Pathway. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-15, 2016.

ERSEL, M.; UYANIKGIL, Y.; AKARCA, F. K.; OZCETE, E.; ALTUNCI, Y. A.; KARABEY, F.; CAVUSOGLU, T.; MERAL, A.; YIGITTURK, G.; CETIN, E. O. Effects of silk sericina on incision wound healing in a dorsal skin flap wound healing rat model. **Medical Science Monitor**, v. 22, n. 1, p. 1064-1078, 2016.

ESER, F.; AKTEKIN, L. A.; BODUR, H.; ATAN, Ç. Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. **Neurology India**, v. 57, n. 4, p. 434-437, 2009.

FONSECA, N. M.; FERREIRA, F. X.; RUZI, R. A.; PEREIRA, G. C. S. Abordagem simplificada do nervo ciático por via posterior, no ponto médio do sulco glúteo-femoral, com uso de neuroestimulador. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 6, p. 764-773, 2002.

FREITAS, J. S.; CARNEIRO-JUNIOR, M. A.; FRANCO, F. S.C.; REZENDE, L. S.; SANTOS, A. S.; MAIA, H. O.; MARINS, J. C. B.; NATALI, A. J. Treinamento aeróbio em natação melhora a resposta de parâmetros metabólicos de ratos durante teste de esforço. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n.2, p. 134-138, 2010.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2003.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; MACHADO-GOBATTO, F. B.; PAPOTI, M.; VOLTARELLI, F. A.; CONTARTEZE, R. V. L.; ARAUJO, G. G. Avaliações fisiológicas adaptadas à roedores: aplicações ao treinamento em diferentes modelos experimentais. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 7, n. 1, p. 137-147, 2008.

GRAÇA, D. L. Mielinização, desmielinização e remielinização no sistema nervoso central. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 43, n. 3, p. 292-297, 1988.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Tradução da 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HASSIBA, A. J.; ZOWALATY, M. E.; NASRALLAH, G. K.; WEBSTER, T. J.; LUYT, A. S.; ABDULLAH, A.; ELZATAHRY, A. A. Review of recent research on biomedical applications of electrospun polymer nanofibers for improved wound healing. **Nanomedicine**, v. 11, n. 6, p. 715-737, 2016.

HUANG, W.; BEGUM, R.; BARBER, T.; IBBA, V.; TEE, N. C. H.; HUSSAIN, M.; ARASTOO, M.; YANG, Q.; ROBSON, L. G.; LESAGE, S.; GHEYSENS, T.; SKAER, N. J. V.; KNIGHT, D. P.; PRIESTLEY, J. V. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. **Biomaterials**, v. 33, n.1, p. 59-71, 2012.

ISOBE, T.; IKEBATA, Y.; DO, L. T. K.; TANIHARA, T.; TANIGUCHI, M.; OTO, T. *In vitro* development of OPU-derived bovine embryos cultured either individually or in groups with the silk protein sericina and the viability of frozen-thawed embryos after transfer. **Animal Science Journal**, v.86, n.7, p. 661-665, 2015.

JANG, S.; LEE, J. Effects of physical exercise on the functional recovery of rat hindlimbs with impairments of the sciatic nerve as assessed by 2D video analysis. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 27, n. 3, p. 935-938, 2015.

KEAWLORN, W.; LIMPEANCHOB, N.; TIYABOONCHAI, W.; PONGCHAROEN, S.; SUTHEERAWATTANANONDA, M. The effect of dietary sericin on rats. **Science Asia**, v. 39, n. 1, p. 252-256, 2013.

KOLEY, P.; SAKURAI, M.; AONO, M. Controlled fabrication of silk protein mediated hierarchical hybrid flowers and their excellent adsorption capability of heavy metal ions of Pb(II), Cd(II) and Hg(II). **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 28, n. 8, p. 2380-2392, 2016.

KOLTYN, K. F. Analgesia following exercise – A review. **Sports Medicine**, v. 29, n. 2, p. 85-98, 2000.

KOLTYN, K. F. Exercise induced hypoalgesia and intensity of exercise. **Sports Medicine**, v. 32, n. 8, p. 477-487, 2002.

KUMAR, A. Preliminary screening of silk protein (sericina) for the anti-Leishmanial properties and effect on immune response in visceral leishmaniasis. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, n.7, p. 1182-1187, 2015.

KUNDU, S. C.; DASH, B. C.; DASH, R.; KAPLAN, D. L. Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and

biotechnological applications. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 1 p. 998-1012, 2008.

LI, Y.; JI, D.; CHEN, S.; HU, G. Protective effects of sericin protein on alcohol-mediated liver damage in mice. **Alcohol & Alcoholism**, v. 43, n. 3, p. 246-253, 2008b.

LI, Y.; JI, D.; LIN, T.; ZHONG, S.; HU, G.; CHEN, S. Protective effect of sericin peptide against alcohol-induced gastric injury in mice. **Chinese Medical Journal**, v. 121, n. 20, p. 2083-2087, 2008a.

LIMPEANCHOB, N.; TRISAT, K.; DUANGJAI, A.; TIYABOONCHAI, W. PONGCHAROEN, S.; SUTHEERAWATTANANONDA, M. Sericin reduces serum cholesterol in rats and cholesterol uptake into caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 12519-12522, 2010.

MADURA, T. Pathophysiology of peripheral nerve injury. **Basic principles of peripheral nerve disorders**, Dr. Seyed Mansoor Rayegani, (Ed.), ISBN: 978-953-51-0407-0, InTech, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/basic-principles-of-peripheral-nerve-disorders/pathophysiology-of-peripheral-nerve-injury>. Acesso em: 15 de set. de 2015.

MARTINS, R. S.; BASTOS, D.; SIQUEIRA, M. G.; HEISE, C. O.; TEIXEIRA, M. J. Traumatic injuries of peripheral nerves: a review with emphasis on surgical indication. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 71, n. 10, p. 811-814, 2013.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E. M.; GIANOLLA, R.; CASARINI, D. E.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P. C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1909-1917, 2004.

MINAMOTO, V. B. Efeitos da desnervação no musculo esquelético: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**, v. 20, n. 3, p. 63-69, 2007.

MIRANDA, G. E.; TORRES, R. Y. Epidemiology of Traumatic Peripheral Nerve Injuries Evaluated with Electrodiagnostic Studies in a Tertiary Care Hospital Clinic. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 35, n. 2, p. 76-80, 2016.

MONDAL, M.; TRIVEDI, K.; NIRMAL-KUMAR, S. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn – a review. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 63-76, 2007.

NAGAI, N.; YOSHIMASA, I. Therapeutic effects of sericin on diabetic keratopathy in Otsuka long-evans tokushima fatty rats. **World Journal of Diabetes**, v. 4, n. 6, p. 282-289, 2013.

NAGARAJU, J.; GOLDSMITH, M. R. Silkworm genomics – progress and prospects. **Current Science**, v. 83, n. 4, p. 415-425, 2002.

NASCIMENTO, F. P.; MACEDO-JÚNIOR, S. J.; BORGES, F. R. M. CREMONESE, R. P.; DA SILVA, M. D.; LUIZ-CERUTTI, M.; MARTINS, D. F., RODRIGUES, A. L. S.; SANTOS, A. R. S. Thalidomide reduces mechanical hyperalgesia and depressive-like behavior induced by peripheral nerve crush in mice. **Neuroscience**, v. 303, n. 1, p. 51-58, 2015.

NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 82, n. 4, p. 163-201, 2007.

NIJ, J.; KOSEK, E.; OOSTERWIJCK, J. V.; MEEUS, M. Dysfunctional endogenous analgesia during exercise in patients with chronic pain: to exercise or not to exercise? **Pain Physician**, v. 2012, n. 15, p. 205-213, 2012.

OKAMOTO, F.; FURLANETO, F. P. B; MARTINS, A. N. Amora preta: quem é quem. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 1, n. 2, p.1-6, 2013.

OLIVEIRA, D. M.; DOURADO, G. K. Z. S.; CESAR, T. B. Hesperidin associated with continuous and interval swimming improved biochemical and oxidative biomarkers in rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 10, n. 27, p. 1-7, 2013.

ONSA-ARD, A.; SHIMBHU, D.; TOHARUS, J.; SUTHEERAWATTANANONDA, M.; PANTAN, R.; TOCHARUS, C. Hipotensive and vasorelaxant effects of sericin-derived oligopeptides in rats. **Pharmacology**, v. 2013, n. 1, p. 1-8, 2013.

PADAMWAR, M. N.; PAWAR, A. P.; DAITHANKAR, A. V.; MAHADIK, K. R. Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 1, p. 250-257, 2005.

PADOL, A. R.; JAYAKUMAR, K.; MOHAN, K.; MANOCHAYA, S. Natural biomaterial silk proteins: Applications in tissue repair. **International Journal of Materials and Biomaterials Applications**, v. 2, n. 4, p. 19-24, 2012.

PAPAVERO, N.; PUJOL-LUZ, J. R. Notas sobre o bicho-da-seda no folclore chinês. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 1, p. 141-142, 2011.

PATEL, R. J.; MODASIYA, M. K. Sericin: Pharmaceutical Applications. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 913-917, 2011.

PORTO, A. J. Sericicultura no estado de São Paulo. **Boletim de Indústria Animal**, v. 71, n. 3, p. 291-302, 2014.

POSSAMAI, F.; SIEPKO, C. M.; ANDRÉ, E. S. Investigação dos efeitos do exercício terapêutico sobre a regeneração nervosa periférica. **Acta Fisiátrica**, v. 17, n. 4, p. 142-147, 2010.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. **Neuroscience**, 3. ed. Massachusetts: Publishers Sunderland, 2004.

RAJPUT, S. K.; KUMAR, M. Sericin – A Unique Biomaterial. **Journal of Polymer and Textile Engineering**, v. 2, n. 3, p. 29-35, 2015.

RITTER, L. L. N.; SANTOS, W. L. M.; RODRIGUES, J. G.; ALMEIDA, T. R.; NETO, O. B. Treinamento físico por natação melhora perfil hepático em ratos Wistar tratados com dieta hiperlipídica. **Coleção Pesquisa em Educação Física**, v. 11, n. 2, p. 183-190, 2012.

RUITER, G. C. W.; SPINNER, R. J.; VERHAAGEN, J. MALESSY, M. J. A. Misdirection and guidance of regenerating axons after experimental nerve injury and repair. **Journal of Neurosurgery**, v. 120, n. 2, p. 493–501, 2014.

SAADAT, S.; ESLAMI, V.; RAHIMI-MOVAGHAR V. The incidence of peripheral nerve injury in trauma patients in Iran. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery**, v. 17, n. 6, p. 539-544, 2011.

SAROVART, S.; SUDATIS, B.; MEESILPA, P.; GRADY, B. P.; MAGARAPHAN, R. The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. **Reviews on Advanced Materials Science**, v.5, n.1, p. 193-198, 2003.

SASAKI, M.; YAMADA, H.; KATO, N. Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1505-1511, 2000.

SAVASTANO, L. E.; LAURITO, S. R.; FITT, M. R.; RASMUSSEN, J. A.; POLO, V. G.; PATTERSON, S. I. Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 30, n. 227, p. 166-180, 2014.

SENGUPTA, P. The laboratory rat: relating its age with humans. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 6, p. 624-630, 2013.

SEO C. W.; UM, I. C.; RICO, C. W.; KANG, M. Y. Antihyperlipidemic and body fat-lowering effects of silk proteins with different fibroin/sericin compositions in mice fed with high fat diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 4192-4197, 2011.

SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453-462, 2009.

SILVA, D. M. R.; GOMES-FILHO, A.; OLIVON, V. C.; SANTOS, T. M. S.; BECHER, L. K.; SANTOS, R. A. S.; LEMOS, V. S. Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. **Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 1, p. 1272-1277, 2011.

SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Revista Neurociências**, v. 15, n. 3, p. 226-233, 2007.

SIRITIENTONG, T.; BONANI, W.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C. ARAMWIT, P. The effects of bombyx mori silk strain and extraction time on the molecular and biological characteristics of sericina. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 2, p. 241-249, 2016.

SOUZA, M. F.; KRAYCHETE, D. C. A ação analgésica da lidocaína intravenosa no tratamento da dor crônica: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, n. 5, p. 386-392, 2014.

STA, M.; CAPPAERT, N. L. M.; RAMEKERS, D.; BAAS, F.; WADMAN, W. J. The functional and morphological characteristics of sciatic nerve degeneration and regeneration after crush injury in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 2014, n. 222, p. 189-198, 2014.

STAFFORD, M. A.; PENG, P.; HILL, D. A. Sciatica: a review of history, epidemiology, pathogenesis, and the role of epidural steroid injection in management. **British Journal of Anesthesia**, v. 99, n. 4, p. 461-473, 2007.

SVENNIGSEN, A. F.; DAHLIN, L. B. Repair of the peripheral nerve – remyelination that Works. **Brain sciences**, v. 3, n. 3, p. 1182-1197, 2013.

TAYLOR, C. A.; BRAZA, D.; RICE, J. B.; DILLINGHAM, T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 87, n. 5, p. 381-385, 2008.

TEODORI, R. M.; BETINI, J.; OLIVEIRA, L. S.; SOBRAL, L. L.; TAKEDA, S. Y. M.; MONTEBELO, M. I. L. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. **Neural Plasticity**, v. 2011, n. 1, p. 1-8, 2011.

VALAT, J.; GENAVAY, S.; MARTY, M.; ROZENBERG, S.; KOES, B. Sciatica **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 24, n. 2, p. 241-252, 2010.

VICENTE, E. J. D.; VIOTTO, M. J. S.; BARBOSA, C. A. A.; VICENTE, P. C. Estudo das relações anatômicas e suas variações entre o nervo ciático e o músculo piriforme. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 3, p. 227-232, 2007.

WANG, Z.; WANG, J.; YANG, J. LUO, Z.; YANG, W.; XIE, H.; HUANG, K.; WANG, L. A neuroprotective sericina hydrogel as effective neuronal cell carrier for the repair of ischemic stroke. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 44, p. 1-34, 2015.

WARAPORN, K.; LIMPEANCHOB, N.; TIYABOONCHAI, W.; PONGCHAROEN, S.; SUTHEERAWATTANANONDA, M. Effects of silk sericin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells. **Biological Research**, v. 45, n. 1, p. 45-50, 2012.

YAN, J.; ZHANG, L.; YAN, Y.; SANGER, J. R.; JENSEN, E. S.; MATLOUB, H. S. Improved animal model for vibration injury study. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 37, n.3, p. 159-169, 2010.

YU, Y.; ZHANG, P.; YIN, X.; HAN, N.; KOU, Y.; JIANG, B. Specificity of motor axon regeneration: a comparison of recovery following biodegradable conduit small gap tubulization and epineurial neuroorrhaphy. **American Journal of Translational Research**, v.7, n.1, p. 53-65, 2015.

ZHANG, Y. Q.; YAN, M.; YUN-YUE, X.; WEI-DE, S.; JIAN-PING, M. REN-YU, X. Silk sericin – insulin bioconjugates: Synthesis, characterization and biological activity. **Journal of Controlled Release**, v.115, n. 1, p. 307-315, 2006.

ZHAORIGETU, S.; SASAKI, M.; KATO, N. Consumption of Sericin Suppresses Colon Oxidative Stress and Aberrant Crypt Foci in 1, 2-dimethylhydrazine-treated rats by colon undigested sericin. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, n. 1, p. 297-300, 2007.

ZILIC, L.; GARNER, P. E.; YU, T.; ROMAN, S.; HAYCOCK, J. W.; WILSHAW, S. An anatomical study of porcine peripheral nerve and its potential use in nerve tissue engineering. **Journal of Anatomy**, v. 227, n. 3, p. 302-314, 2015.

5 ARTIGO CIENTIFICO 01

Ação da sericina no reparo nervoso inicial, associada ou não ao exercício físico de natação em ratos Wistar

Jean Carlos Debastiani¹, André Junior Santana¹, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro², Rose Meire Costa Brancalhão³, Gladson Ricardo Flor Bertolini⁴

¹Mestrando do programa de Biociência e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

²Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Estadual de Maringá.

³Pós-Doutorado em Biologia Celular pela Universidade Estadual de Maringá.

⁴Doutor em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo.

Departamento e instituição: Laboratório de estudo das lesões e recursos fisioterapêuticos e Laboratório de biologia estrutural e funcional da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE.

Endereço para correspondência:

Gladson Ricardo Flor Bertolini

Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos da UNIOESTE

Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário 85819-110, Cascavel, Paraná, Brasil.

E-mail: gladson_ricardo@yahoo.com.br

Não existe conflito de interesse.

Título Resumido: Sericina no reparo nervoso associada ou não ao exercício físico

RESUMO

Objetivo: Analisar os efeitos do tratamento da sericina, associada ou não ao exercício de natação, com sobrecarga, sobre o reparo inicial do nervo isquiático após compressão, em ratos Wistar.

Métodos: Foram separados 40 animais em cinco grupos: controle; lesão; lesão-sericina; lesão-natação; e lesão-sericina-natação. Durante o procedimento de axonotimese, foi aplicada sobre a lesão a sericina nos grupos lesão-sericina e lesão-sericina-natação. Os grupos lesão-natação e lesão-sericina-natação realizaram exercício de natação com sobrecarga, por uma semana, iniciando no terceiro dia pós-operatório (PO), sendo avaliados quanto à função, à nocicepção e à hipernocicepção. A eutanásia foi realizada no 8º PO, e dois fragmentos do nervo foram coletados e preparados para análise quantitativa e descritiva, com relação a quantidade total de fibras nervosas viáveis, não viáveis, diâmetro da fibra nervosa, do axônio e espessura da bainha de mielina.

Resultados: No índice funcional isquiático não houve melhora significativa até o oitavo dia. O teste de “Von Frey” na cicatriz cirúrgica e fáscia plantar indicaram redução do quadro algico e alodinia, para os grupos lesão-natação e lesão-sericina-natação. A análise morfológica apresentou características semelhantes nos grupos lesão-sericina, lesão-natação e lesão-sericina-natação, porém houve diferença numérica significativa de fibras nervosas não viáveis menores dos grupos lesão-natação e lesão-sericina-natação em relação aos demais.

Conclusões: A proteína sericina isolada apresentou características pró-inflamatórias. Houve melhora da alodinia e redução do quadro algico no local da incisão cirúrgica, vinculado a possível efeito aquático. Não houve evidências aceleração do reparo nervoso no oitavo dia após a lesão.

Palavras-chave: Biomateriais, Compressão nervosa, Exercícios em meio aquático, Proteína da seda.

ABSTRACT

Objective: To analyze the effects of sericin treatment, associated or not with swimming exercise, with overload, about initial sciatic nerve repair after compression, in Wistar rats.

Methods: 40 animals were divided into five groups: control; Injury; Injury-sericin; Injury-swimming; and injury-sericin-swimming. During the axonotmesis procedure, the sericin injury was applied to the injury-sericin and injury-sericin-swimming groups. The injury-swimming and injury-sericin-swimming groups underwent swimming overload for one week, beginning on the third postoperative day (PO), being evaluated for function, nociception and allodynia. Euthanasia was performed at the 8th PO, and two fragments of the nerve were collected and prepared for quantitative and descriptive analysis, in relation to the total amount of viable, non-viable nerve fibers, nerve fiber diameter, axon and myelin sheath thickness.

Results: In the sciatic functional index there was no significant improvement until the eighth day. The "von Frey" test in the surgical scar and plantar fascia indicated reduction of pain and allodynia for the injury-swimming and injury-sericin-swimming groups. The morphological analysis presented similar characteristics in the injury-sericin, injury-swimming and injury-sericin-swimming groups, but there was a significant numerical difference of smaller non-viable nerve fibers between the injury-swimming and injury-sericin-swimming groups compared to the others.

Conclusions: The serine protein isolated presented proinflammatory characteristics. There was improvement of allodynia and decrease of the pain at the site of the surgical incision, linked to a possible aquatic effect. There was no evidence of acceleration of the nerve repair on the eighth day after the injury.

Key words: Biomaterials, Nerve compression, Water exercises, Silk protein.

Introdução

Lesões nervosas periféricas (LNPs) são frequentes, principalmente as traumáticas, como a compressão, o esmagamento e o estiramento, o que implica em alterações na função motora voluntária, levando a morbidades, incapacidades nas atividades de vida diária e laborais. O tratamento geralmente é longo, com consequente aumento dos custos para os sistemas de saúde público e previdenciário,¹ tendo maior incidência em adultos jovens.²

Diversas abordagens terapêuticas são utilizadas no tratamento de LNPs,³ havendo benefícios do exercício físico na regeneração nervosa periférica, como o aumento da força, resistência e mobilidade,^{4,5} além da melhora na mielinização e desenvolvimento das fibras nervosas.⁶

Exercícios em ambiente aquático apresentam bom prognóstico, revelando melhora na recuperação funcional após lesão do nervo isquiático,^{5,6} favorecem a remoção de mielina degenerada,⁷ a recuperação do diâmetro axonal,⁸ além de estimular o crescimento e desenvolvimento de novas células e aumentar a presença de fatores de crescimento neuronais.⁹ Teodori et al.,⁵ relatam que a natação aplicada nas fases agudas e tardias, em modelos de compressão nervosa, revelou uma aceleração no processo de regeneração do nervo isquiático.

Contudo, outras pesquisas demonstraram atrasos na recuperação funcional com esse tipo de exercício,⁸ ou nenhum efeito sobre a força muscular,¹⁰ e pelo processo de regeneração lento, problemas como a reinserção nervosa inadequada e ineficiência da função nervosa são possíveis, gerando impactos diretos no resultado final.¹ Isto denota a necessidade de investigação sobre o efeito do exercício físico no

reparo nervoso, bem como a associação deste com substâncias auxiliares do processo.

Nesse sentido, o biopolímero da seda sericina, apresenta potencial uso em biomedicina. Tal proteína, produzida pela lagarta bicho-da-seda (*Bombyx mori*), juntamente com a fibroína, compõem o casulo de seda.¹¹ A sericina demonstrou influência na regeneração de tecido cartilaginoso, favorecendo a proliferação celular,¹² acelerando a regeneração de tecido cutâneo,¹³ atuando no processo de cicatrização e podendo levar a menores níveis de mediadores inflamatórios.^{14,15} No reparo neuronal Wang et al.,¹⁶ demonstraram seu efeito neuroprotetor, promovendo o crescimento *in vitro* de neurônios. Além disso, outros potenciais efeitos tornam a sericina foco de interesse em diversos segmentos, visto as possibilidades de uso.

Diante do exposto, a sericina apresenta amplas possibilidades de aplicações, como no reparo de LNP e, assim, este estudo objetivou analisar os efeitos do tratamento da sericina, associada ou não a exercício de natação, com sobrecarga, sobre o reparo do nervo isquiático após compressão, em ratos *Wistar* no período inicial do reparo nervoso.

Material e métodos

Caracterização da amostra

A pesquisa seguiu todos os procedimentos experimentais e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal. Foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar*, com 8 ± 2 semanas de idade e peso de $255,37 \pm 27,39$, mantidos em ambiente controlado, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, água e ração *ad libitum*. Esses animais foram separados, equitativa e aleatoriamente em

cinco grupos: controle (CON), não realizou nenhum tipo de procedimento; lesão (LES), realizado protocolo de lesão nervosa isquiática e não recebeu nenhum tipo de tratamento; lesão-sericina (LSER), protocolo de lesão nervosa isquiática e tratado com aplicação da proteína sericina hidrolisada diretamente na lesão; lesão-natação (LNAT), lesão nervosa isquiática e tratamento com natação; e lesão-sericina-natação (LSRNT), submetido à lesão nervosa, tratamento com sericina, e posteriormente natação.

Todos os animais foram submetidos às mesmas avaliações ao longo do período experimental.

Lesão nervosa isquiática e aplicação da proteína sericina

Prévio ao procedimento cirúrgico, os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina (95 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (12 mg/Kg) via intraperitoneal. Na sequência, o animal foi posicionado em decúbito ventral, com abdução dos quatro membros, e preparada a região cirúrgica do membro pélvico direito. A incisão foi realizada paralelamente às fibras musculares do bíceps femoral, possibilitando a exposição do nervo isquiático. Com auxílio de uma pinça hemostática, o nervo isquiático foi comprimido durante 30 segundos, utilizando-se como referência de pressão o segundo dente da cremalheira.¹⁷ A compressão nervosa foi realizada, pelo mesmo pesquisador. Em seguida foi realizada uma sutura epineural na região lesionada, com fio de nylon 10.0, possibilitando a localização exata da lesão e coleta dos segmentos do nervo no momento da eutanásia.³

Após a marcação epineural, os animais de LSER e LSRNT receberam a aplicação de 100 µL de sericina hidrolisada, por animal, por meio de uma única

aplicação.¹⁸ Posteriormente, foi realizado o fechamento cirúrgico por camadas, e realocação nas mesmas condições pré-cirúrgicas.

A sericina foi obtida diretamente de casulos de *B. mori*, fornecidos pela indústria sericícola BRATAC Silk do Brasil (Londrina, Paraná, Brasil). Os casulos foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1 cm² e submetidos ao processo de extração por alta pressão e alta temperatura em autoclave (CS 30 – Primatec, Itu, SP, Brasil), a 120° C e pressão de 1 kgf/cm², por 1 hora.¹⁹ Não houve adição de produtos químicos durante a extração e foi utilizado 100 mL de água destilada para cada 6 g de casulo. A fibroína foi separada utilizando-se uma peneira de 18 malhas, a solução de sericina foi congelada (-20°C) e utilizada na forma hidrolisada durante o experimento.

Natação

O exercício de natação foi realizado com sobrecarga de 10% do peso corporal do animal, durante 15 minutos. A carga foi composta por pesos de chumbo, fixados na região abdominal com cinta de velcro, visando a não interferir na mobilidade durante o exercício. O protocolo iniciou no 3º dia após a realização da axoniotmese e mantido diariamente até o 7º dia, sendo realizada a eutanásia dos animais no 8º dia. A carga foi determinada diariamente pela pesagem prévia dos animais.

Nos dez dias que antecederam ao procedimento cirúrgico, todos os animais foram habituados ao protocolo de natação e aos testes. Os animais de CON, LES e LSER, não realizaram o protocolo de exercício, porém foram submetidos ao ambiente aquático por 10 segundos, nos mesmos dias do treino estabelecido de LNAT e LSRNT, simulando o estresse do ambiente aquático.²⁰ Foi utilizado um

tanque oval, com 60 cm de profundidade e capacidade para 200 L, e temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

Índice funcional do isquiático (IFC)

Para mensurar o índice funcional do isquiático, foi utilizada uma esteira acoplada a um sistema de imagem (Insight®), que obteve dados das pegadas dos animais. As medidas de: comprimento da pata (distância entre os dois pontos extremos da pegada longitudinalmente), espalhar total dos dedos (distância entre os dois pontos mais extremos da pegada transversalmente), espalhar dos dois dedos intermediários, tanto do lado experimental, quanto do contralateral, foram submetidos à fórmula específica, apresentados em percentual negativo, sendo 0 (zero) representativo de função normal e -100 (menos 100) representativo de perda total da função.²¹

Foram realizadas cinco avaliações, sendo a primeira (AV1) 24 horas antes do procedimento cirúrgico, a segunda (AV2) no 3º dia do pós-operatório, antes de iniciar o protocolo de natação e a terceira (AV3) também no 3º dia. Todavia, após o término da natação, a quarta avaliação (AV4) foi realizada no 7º dia após o tratamento por natação e, a quinta (AV5) realizada previamente à eutanásia, no 8º dia de pós-operatório. A ordem dos testes foi estabelecida e seguida durante todo o experimento, sendo primeiro o teste do IFC, em seguida o teste com analgesímetro digital de “Von Frey”, porém a ordem de realização foi randomizada a fim de minimizar a influência do tempo e fadiga dos avaliadores.

Teste tipo filamento de “Von Frey” Digital

O analgesímetro digital tipo filamento de “Von Frey” (Insight®), consistiu na aplicação de um filamento na região do procedimento cirúrgico, com o animal contido, sendo posicionada a ponteira de polipropileno perpendicularmente a área, com aumento gradativo da pressão exercida até que o animal realizasse o movimento de retirada do membro pélvico. Em seguida, foi realizado o mesmo estímulo na face plantar do membro pélvico direito, com o animal em uma caixa elevada com piso de tela, possibilitando o acesso e o posicionamento perpendicular com o aumento gradativo da pressão do filamento, sendo interrompido o teste assim que o animal elevasse o membro, ficando registrado o valor da força necessária para retirada. Foram realizadas três medidas por avaliação, em cada região, e adotada a média entre elas para análise estatística.²²

Coleta e eutanásia

No 8º dia após o procedimento de lesão nervosa, os animais foram pesados e anestesiados. O nervo isquiático direito foi coletado e seccionado no sentido distal em dois fragmentos de um centímetro cada. O primeiro (fragmento proximal) foi obtido imediatamente após o ponto de lesão, identificado pelo fio de nylon 10.0, e o segundo (fragmento distal) foi coletado na sequência. Após esse procedimento, os animais ainda sob o efeito do anestésico foram eutanasiados.

Análise morfológica

Os fragmentos do nervo isquiático foram fixados em paraformoldeído tamponado, por 24 horas, sendo que o fragmento distal foi pré-corado com tetróxido de ósmio 2%. Posteriormente, foram processados para emblocamento em parafina histológica e cortados transversalmente em 5 µm de espessura. As lâminas obtidas

do fragmento proximal foram coradas em hematoxilina e eosina (H/E),²³ para as análises descritivas do nervo, enquanto que o distal foi submetido às análises morfométricas. Na sequência, as lâminas foram fotomicrografadas em microscópio Olympus BX 50.

Para as análises morfométricas utilizou-se o programa Image-Pro-Plus 6.0, no qual foram observados os seguintes parâmetros: quantidade total de fibras nervosas viáveis (FNV), quantidade total de fibras nervosas não viáveis (FNNV), diâmetro do axônio (DAX), diâmetro da fibra nervosa (DFN), e espessura da bainha de mielina (EBM), sendo consideradas FNNV, aquelas que não apresentassem contornos definidos, passíveis de mensuração. As fibras nervosas foram analisadas com relação ao diâmetro, em menores e maiores que 4 μm . Para tanto, foi utilizado como base os estudos de Mazzer et al.,²⁴ e Mandelbaum-Livnat et al.,²⁵ que descreveram a presença de fibras nervosas de diâmetros menores e maiores em lesões do nervo isquiático. Foram efetuadas quatro imagens de cada corte, sendo nos quadrantes superior esquerdo, superior direito, inferior esquerdo e inferior direito, em aumento de 1.000 vezes. A análise foi feita de forma cega com relação aos grupos, sendo 25 fibras maiores e 25 menores de 4 μm de diâmetro, por quadrante, totalizando 200 fibras por nervo, ou até sua totalidade.

Análise estatística

Os resultados foram expressos por meio de estatística descritiva e analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Verificada a normalidade dos dados, procedeu-se a análise por Anova unidirecional, com pós-teste LSD (teste t), sendo o nível de significância de $\alpha = 0,05$, para tanto se utilizou o programa Bioestat 5.0.

Resultados

Índice funcional isquiático

O CON não demonstrou diferenças significativas entre as cinco avaliações realizadas nesse grupo ($p=0,870$). Já LES, LSER, LNAT e LSRNT apresentaram comportamento idêntico, havendo diferença significativa da AV1, realizada previamente a lesão, para as demais avaliações (AV2, AV3, AV4 e AV5) efetuadas após a lesão ($p<0,001$).

Na comparação entre os grupos, no momento das avaliações, em AV1 não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,274$). Nos momentos AV2, AV3, AV4 e AV5, houve diferenças entre CON e todos os demais grupos ($p<0,001$) (Tabela 01).

Tabela 01 – Média e desvio padrão do IFC referente a eutanásia do oitavo dia, e diferenças estatísticas.

	CON	LES	LSER	LNAT	LSRNT
AV1	-12,1±24,0 ^{aA}	3,07±21,4 ^{aA}	-17,2±16,2 ^{aA}	-7,0±7,1 ^{aA}	-13,5±19,8 ^{aA}
AV2	-10,1±14,9 ^{bA}	-60,02±19,2 ^{bB}	-66,0±9,5 ^{bB}	-67,5±7,6 ^{bB}	-63,7±16,7 ^{bB}
AV3	-5,1±25,3 ^{bA}	-62,64±10,8 ^{bB}	-67,2±11,8 ^{bB}	-50,6±34,3 ^{bB}	-71,6±19,5 ^{bB}
AV4	-0,7±11,6 ^{bA}	-55,40±12,5 ^{bB}	-61,6±16,9 ^{bB}	-61,5±19,0 ^{bB}	-58,9±36,3 ^{bB}
AV5	-9,3±27,8 ^{bA}	-57,58±22,8 ^{bB}	-68,2±8,0 ^{bB}	-62,3±19,3 ^{bB}	-64,0±15,6 ^{bB}

Obs.: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa no grupo quando comparado suas avaliações (coluna), letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos no momento da avaliação (linha).

Teste com analgesímetro tipo filamento de “Von Frey” digital

Diante do teste de filamento tipo “Von Frey” digital, na região da cicatriz cirúrgica, o CON não demonstrou diferenças significativas ($p=0,530$). Já o LES e LSER se comportaram de forma idêntica, apresentando diferença da AV1 para as demais ($p<0,001$). LNAT obteve diferença da AV1 para as demais ($p<0,001$), e da AV2 para AV4 ($p=0,018$) e AV5 ($p=0,023$), tendo LSRNT comportamento idêntico,

com diferença da AV2 para AV4 ($p=0,006$) e AV5 ($p=0,002$), indicando uma redução do quadro algico no decorrer tempo.

Ainda em referência à cicatriz cirúrgica, na comparação entre os grupos, não houve diferença significativa na AV1 entre os grupos ($p=0,383$). Nos momentos AV2 e AV3, foram observadas diferenças entre CON e todos os demais grupos ($p<0,001$). Em AV4 houve diferença entre CON e os demais ($p<0,001$), e de LSER para LES ($p=0,015$), e LSRNT ($p=0,011$). Para AV5 identificou-se diferença entre CON e os demais ($p<0,001$), do LSER para o LES ($p=0,020$) e LSRNT ($p<0,001$), e LNAT para o LSRNT ($p=0,030$) (Tabela 02).

Tabela 02 – Média e desvio padrão do teste de “*Von Frey*” da cicatriz cirúrgica, e da fásia plantar referente a eutanásia do oitavo dia, e diferenças estatísticas significativas.

		CON	LES	LSER	LNAT	LSRNT
Cicatriz Cirúrgica	AV1	145,4±10,1 ^{aA}	137,2±13,6 ^{aA}	136,3±13,5 ^{aA}	130,1±10,9 ^{aA}	139,6±19,7 ^{aA}
	AV2	143,4±13,2 ^{aA}	48,4±8,6 ^{bB}	38,1±15,5 ^{bB}	39,9±9,5 ^{bB}	38,9±14,0 ^{bB}
	AV3	144,7±15,9 ^{aA}	49,0±12,2 ^{bB}	36,6±15,0 ^{bB}	48,3±4,7 ^{bcB}	48,8±9,5 ^{bcB}
	AV4	150,0±13,5 ^{aA}	57,7±6,9 ^{bB}	44,2±11,6 ^{bc}	51,0±8,1 ^{cBC}	58,4±6,6 ^{cB}
	AV5	153,8±10,3 ^{aA}	54,5±9,3 ^{bB}	43,7±7,4 ^{bc}	50,5±6,9 ^{cBC}	60,6±6,8 ^{cd}
Fásia Plantar	AV1	68,1±11,5 ^{aA}	68,4±13,0 ^{aA}	55,3±13,1 ^{aA}	68,0±10,0 ^{aA}	70,9±7,1 ^{aA}
	AV2	66,0±9,9 ^{aA}	32,6±11,3 ^{bB}	31,9±10,1 ^{bB}	23,6±6,7 ^{bB}	24,0±4,7 ^{bB}
	AV3	68,3±10,8 ^{aA}	35,1±11,3 ^{bB}	29,4±11,4 ^{bB}	30,5±5,3 ^{bcB}	31,4±8,9 ^{bcB}
	AV4	74,1±15,2 ^{aA}	39,5±7,6 ^{bB}	32,5±8,8 ^{bB}	36,0±5,6 ^{cdB}	36,7±8,2 ^{cB}
	AV5	69,7±11,9 ^{aA}	39,0±11,0 ^{bBC}	31,0±6,8 ^{bB}	41,6±3,6 ^{dC}	30,5±4,4 ^{bcB}

Obs.: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa no grupo quando comparado suas avaliações (coluna), letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos no momento da avaliação (linha).

Na região da fásia plantar, o CON não demonstrou diferenças entre as avaliações ($p=0,77$). Já LES e LSER apresentaram similaridades, mostrando diferença da AV1 para as demais ($p<0,001$). No LNAT houve diferenças entre a AV1 e as demais ($p<0,001$) e, entre a AV2 para AV4 ($p=0,015$) e AV5 ($p<0,001$), e da AV3 para a AV5 ($p=0,004$), já o LSRNT apresentou diferença da AV1 para as demais ($p<0,001$) e de AV2 para AV4 ($p=0,001$).

Na comparação entre os grupos, referente a fáscia plantar, não houve diferença no momento da AV1 ($p=0,1014$). Já em AV2, AV3 e AV4, foram observadas diferenças entre CON e os demais grupos ($p<0,001$). A AV5 mostrou diferença entre CON e os demais grupos ($p<0,001$) e de LNAT para LSER ($p<0,0241$) e LSRNT ($p=0,0181$) (Tabela 02).

Análise morfológica

O nervo isquiático do CON revelou características teciduais e celulares preservadas, formado por fibras nervosas de diferentes diâmetros, mielínicas e amielínicas, com presença das células de Schwann (Figuras 1A e A1). As bainhas conjuntivas, endoneuro, perineuro e epineuro também se apresentaram preservadas. No grupo LES a maioria das fibras nervosas se apresentaram alteradas, diâmetro diferenciado do CON, aumento no número de células de Schwann, infiltrado inflamatório, que formaram aglomerados de células gigantes e macrófagos (Figuras 1B e B1).

Nos grupos SER, LNAT e LSRNT (Figuras 1C-1E e C1-E1), os aspectos morfológicos estavam semelhantes entre si, com alteração axonal, hiperceluralidade, decorrente do aumento no número de células de Schwann e da presença de infiltrado inflamatório.

A contagem do número total de FNV, tanto as fibras de diâmetro maior, quanto as menores de 4 μm , mostraram diferença estatística de todos os grupos em relação ao CON ($p<0,001$). Já os valores de FNNV maiores, mostraram diferença do CON em relação aos demais grupos ($p<0,010$). Na variável FNNV menores, foram observadas diferenças entre CON e os demais grupos ($p<0,001$), de LES entre

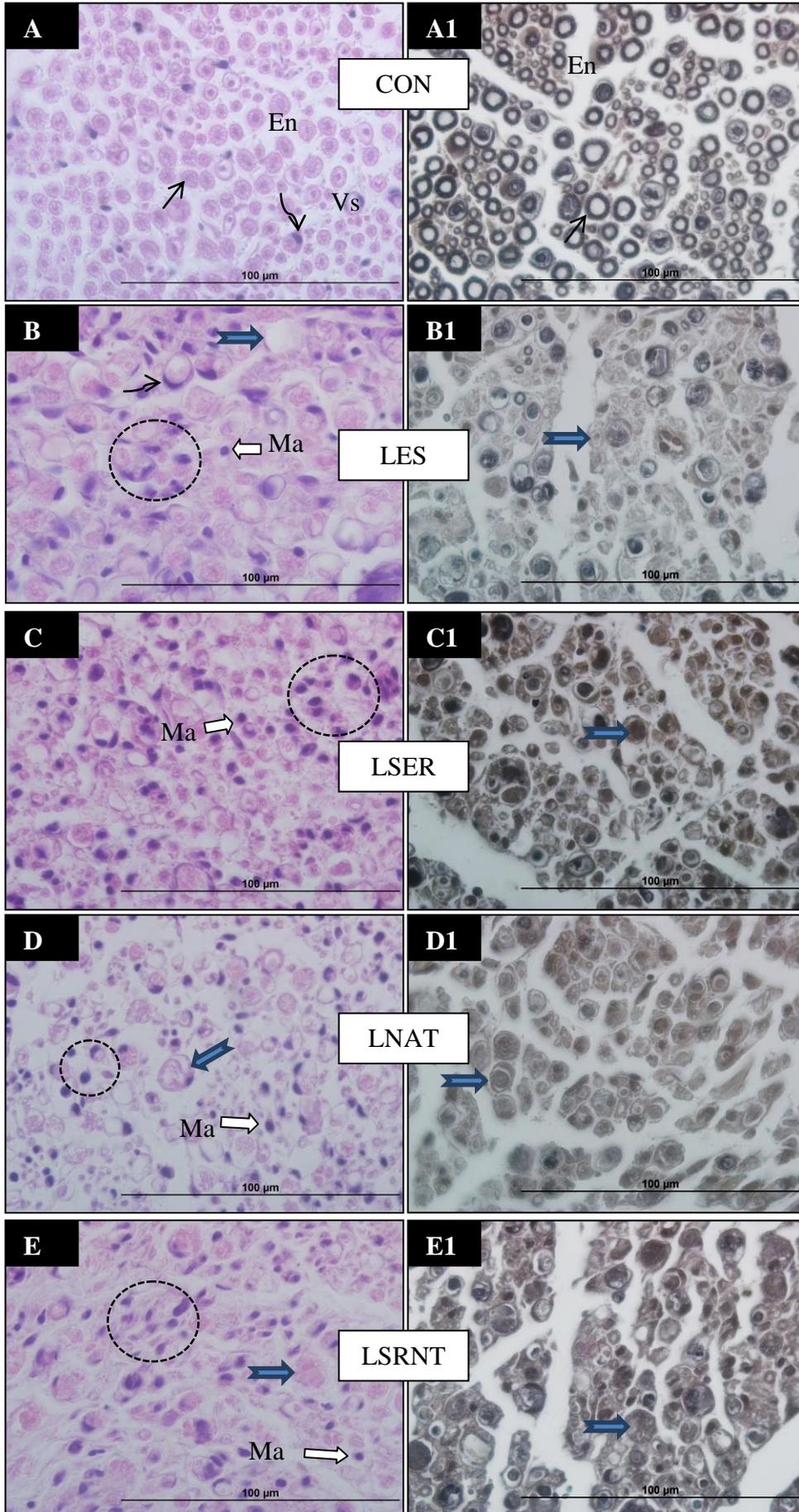


Figura 01 – Fotomicrografias do nervo isquiático de ratos *Wistar* no 8º dia pós-lesão, corte transversal, hematoxilina-eosina (A - E) e tetróxido de ósmio (A1 – E1). A e A1, grupo controle, fibras nervosas íntegras, com axônio e bainha de mielina (seta fina), núcleo de células de Schwann (seta curva), vaso sanguíneo (Vs) e endoneuro (En). B e B1, grupo lesão com fibras nervosas degeneradas (seta azul), infiltrado inflamatório (círculo pontilhado) e células de Schwann. C e C1, grupo sericina; D e D1, grupo natação; e E e E1, grupo sericina e natação com fibras nervosas degeneradas, núcleo de células de Schwann, hiperplasticidade, infiltrado inflamatório, fibras de pequeno diâmetro (ponta de seta) e vasos sanguíneos.

todos os grupos (LSER $p=0,028$, LNAT $p<0,001$ e LSRNT $p<0,001$), e de LSER para todos (LNAT $p=0,038$ e LSRNT $p=0,006$).

Na análise da média dos DFN dos grupos maiores que 4 μm , foram observadas diferenças somente de CON para os demais grupos ($p<0,001$). Já a média do DFN menores, não houve diferença ($p=0,860$), o mesmo ocorreu na avaliação da média dos DAX das fibras maiores ($p=0,200$) e menores ($p=0,630$). Na avaliação da EBM maiores, houve diferença do CON para os demais ($p<0,001$) não sendo observado diferença nas fibras menores ($p=0,086$) (Tabela 03).

Tabela 03 – Comparativo das médias, maiores e menores de 4 μm , no oitavo dia de pós-operatório, de fibras nervosas viáveis (FNV), fibras nervosas não viáveis (FNNV), diâmetro das fibras nervosas (DFN), diâmetro dos axônios (DAXN) e espessura da bainha de mielina (EBM).

		CON	LES	SER	LNAT	LSRNT
FNV	> 4 μm	590,1 \pm 40,5 ^A	15,5 \pm 8,0 ^B	14,5 \pm 19,3 ^B	7,0 \pm 4,5 ^B	6,1 \pm 3,2 ^B
	< 4 μm	18,5 \pm 12,0 ^A	5,0 \pm 3,8 ^B	3,6 \pm 1,6 ^B	4,66 \pm 3,61 ^B	4,3 \pm 2,8 ^B
FNNV	> 4 μm	17,8 \pm 4,3 ^A	411,1 \pm 11,2 ^B	487,6 \pm 51,0 ^B	449,5 \pm 84,9 ^B	438,8 \pm 48,0 ^B
	< 4 μm	0,0 \pm 0,0 ^A	56,5 \pm 23,3 ^B	93,1 \pm 24,1 ^C	127,6 \pm 20,4 ^D	139,8 \pm 46,6 ^D
DFN	> 4 μm	9,0 \pm 0,4 ^A	6,7 \pm 1,1 ^B	6,5 \pm 0,2 ^B	6,7 \pm 1,1 ^B	6,5 \pm 1,4 ^B
	< 4 μm	3,4 \pm 0,1 ^A	3,4 \pm 0,3 ^A	3,3 \pm 0,3 ^A	3,3 \pm 0,5 ^A	3,3 \pm 0,3 ^A
DAXN	> 4 μm	4,0 \pm 0,4 ^A	3,2 \pm 0,5 ^A	3,1 \pm 0,3 ^A	3,4 \pm 0,8 ^A	3,3 \pm 1,0 ^A
	< 4 μm	1,5 \pm 0,1 ^A	1,57 \pm 0,2 ^A	1,4 \pm 0,1 ^A	1,52 \pm 0,2 ^A	1,5 \pm 0,1 ^A
EBM	> 4 μm	2,5 \pm 0,1 ^A	1,7 \pm 0,2 ^B	1,6 \pm 0,1 ^B	1,6 \pm 0,2 ^B	1,5 \pm 0,2 ^B
	< 4 μm	0,9 \pm 0,1 ^A	0,9 \pm 0,1 ^A	0,9 \pm 0,1 ^A	0,9 \pm 0,2 ^A	0,8 \pm 0,1 ^A

Obs. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos (linha).

Discussão

A localização periférica do nervo isquiático o expõe a lesões nervosas nos membros inferiores, principalmente aquelas que produzem como sintoma a ciatalgia, o que interfere na transmissão dos impulsos nervosos o que pode implicar em

incapacidade funcional, com potencial impacto socioeconômico negativo afetando, sobretudo, indivíduos jovens e produtivos.^{2,26}

O modelo de lesão abordado nesta pesquisa foi proposto por Bridge et al.¹⁷ produzindo uma compressão, em que ocorre rompimento de axônios e desencadeia um processo denominado degeneração Walleriana, no sentido distal à lesão, e que ocorreu em todos os grupos que foram submetidos a lesão neste estudo. Esse processo afeta a estrutura das fibras nervosas em um espaço de tempo de cerca de dois a três dias, sendo que uma cascata de eventos é disparada a partir do local da lesão e envolve, entre outros fatores, a migração de macrófagos, proliferação de células de Schwann, mudanças nos constituintes da matriz extracelular e reorganização do espaço endoneural, como verificado no presente estudo, além da produção de citocinas e aumento de neurotrofinas.²⁶

A hipercelularidade verificada nos grupos lesionados resultou de diversos tipos celulares voltados à reorganização tecidual e funcional, tais como os macrófagos, presentes no coto distal, que removem os restos mielínicos em degeneração, entre o segundo e o sétimo dia após a lesão. Com a extrusão inicial da bainha de mielina, em até três dias após a lesão do axônio, se inicia a divisão e proliferação das células de Schwann, o que explica a grande quantidade de células observadas no oitavo dia após a lesão. As células de Schwann também realizam fagocitose e estão associadas à produção de substâncias quimiotáticas, elas se alinham ao longo da lâmina basal, formando as bandas de Büngner, e auxiliando na orientação do crescimento axonal.²⁶

A regeneração axonal periférica depende de uma resposta inflamatória rápida e eficiente, visto que as células de Schwann e macrófagos comunicam-se por meio de redes de citocinas, controlando a fagocitose e fatores de crescimento. Em

roedores, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, inicia de três a cinco horas após a lesão e o número de macrófagos, tanto endógenos quanto sistêmicos, atinge seu máximo de quatro a sete dias após a lesão. Esses fatos explicam a hiper celularidade observada no oitavo dia após a lesão. Atrasos nesse processo podem levar a perda da capacidade regenerativa.²⁶

Para fins de comparação, não foram encontrados estudos similares do uso da sericina em LNP's, sendo este o primeiro estudo mostrando os dados morfológicos e funcionais advindos da aplicação deste biomaterial, seja tratado diretamente ou não sobre a lesão. No entanto, a perspectiva no que diz respeito à aplicação da sericina em outros tecidos se mostrou promissora,^{12,13,14,15,16} levantando a expectativa de sua aplicação no reparo nervoso periférico.

Quanto aos resultados obtidos no IFC, existiu diferença somente entre o CON e os demais grupos, quando comparado intergrupos, e individualmente houve diferença somente da AV1, realizada previamente a lesão. Dessa forma, o modelo de lesão apresentou-se eficaz em causar alterações significativas na função motora dos animais e perdurou em todos os grupos de intervenção, até o oitavo dia após a lesão nervosa.

Oliveira et al.,⁸ relataram que a natação com sobrecarga na fase inicial da regeneração causou danos à recuperação funcional, e a associação com estimulação elétrica, não teve efeito sobre o reparo nervoso, propondo que os protocolos de intervenção evitem sobrecarga. Contudo, Lós et al.,²⁷ defendem que a intervenção precoce em meio aquático, após reparo cirúrgico de uma lesão nervosa periférica completa, não compromete o processo regenerativo e estimula a neovascularização fisiológica. De forma concordante Teodori et al.,⁵ citaram que o exercício de natação, na fase aguda e tardia da lesão nervosa periférica do nervo

isquiático, em ratos *Wistar*, por esmagamento, acelera a regeneração nervosa e melhora a transmissão sináptica. Porém, os dados obtidos neste estudo, não revelaram melhora funcional nos grupos lesionados, no oitavo dia após a lesão.

Alterações álgicas relacionadas às intervenções, evidenciadas por meio do teste com o analgesímetro digital, realizado na região da incisão cirúrgica, encontrou na comparação por grupo, que o CON não demonstrou alterações, já nos demais grupos a AV1 se mostrou diferente das avaliações seguintes, o que se deve a AV1 ter sido realizada previamente ao procedimento cirúrgico. Nos grupos LNAT e no LSRNT ocorreu um aumento do limiar nociceptivo no decorrer do tempo, relacionado a um efeito do exercício aquático, pois somente os grupos com intervenção por exercício demonstraram esse comportamento, o que sustenta estudos que citam exercícios como estratégia eficaz para o controle do processo inflamatório e da dor, pois alteram os níveis de citocinas inflamatórias, neurotrofinas, neurotransmissores e opióides endógenos.²⁸

Nas AV2 e AV3, houve diferença entre o CON e os demais grupos, e na AV4, denota-se diferença entre o LSER para o LES e LSRNT, sendo que o LSER teve o pior desempenho, denotando que a sericina, usada de forma isolada, se mostrou irritativa, com ação pró-inflamatória, na fase inicial de reparo. Alguns autores sugerem que o uso de sericina aumenta a resposta inflamatória, por causar hipersensibilidade, decorrentes de respostas imunitárias exacerbadas.²⁹ Ressalta-se, entretanto, que o aumento da resposta inflamatória é quesito importante a ser considerado na regeneração nervosa.²⁶ Aramwit et al.,¹⁴ destacaram que a sericina não é tóxica e pode promover cicatrização de feridas cutâneas, sendo que os níveis de mediadores inflamatórios IL-1 β e TNF- α , observados sete dias após a lesão, são significativamente inferiores em feridas tratadas sem a sericina. Em estudo

comparativo nas fibras de seda, com e sem a sericina, observou-se que nas fibras com sericina houve a ativação de células inflamatórias, como polimorfonucleadas, leucócitos, eosinófilos e macrófagos.³⁰

Com a lesão do nervo isquiático o teste realizado na região da fáscia plantar com o analgesímetro digital, buscou identificar alterações por alodinia, com referência ao trajeto nervoso. Na comparação individual, LES e LSER, se comportaram de forma idêntica. No LNAT houve diferença da AV2 para a AV4 e AV5, e no LSRNT da AV2 para AV4, mostrando uma melhora da sensibilidade em ambos os grupos, podendo estar associada ao efeito aquático, visto que, somente os grupos submetidos ao tratamento por exercício de natação, mostraram melhora no decorrer do tempo, concordando com estudos que sugerem a natação como fator para melhorar alodinia em modelos de dor neuropática, mas os mecanismos não são completamente compreendidos.²⁸

No momento da AV5, o LNAT foi diferente de LSER e LSRNT, tendo melhor desempenho, porém não foi diferente do LES, sendo as piores médias associadas ao uso da sericina, evidenciando novamente, um efeito pró-inflamatório.

Com relação aos achados morfométricos, observou-se que a quantidade de FNV, tanto as menores quanto as maiores, mostraram diferença do CON para todos os demais grupos, comprovando que até o oitavo dia, a lesão nervosa ainda era significativa. Já a quantidade de FNNV menores de 4 μm , mostrou diferença do LES para todos os demais e do LSER também para todos os demais, porém com os menores valores observados, já NAT e SRNT foram diferentes de todos os grupos, obtendo os maiores valores. Ressalta-se, no entanto, que não é possível afirmar se estas FNNV estão em processo de regeneração ou degradação. A tendência é que fibras maiores alteradas estejam em processo de degeneração e fibras menores,

estejam em regeneração. Sendo assim, o processo de regeneração ainda em fase inicial, não evidenciou sinais de viabilidade, justificando a falta de funcionalidade adequada observada, todavia, a diferença numérica entre os grupos, que foi significativamente maior em LNAT e LNTSR, pode indicar que houve regulação da ação pró-inflamatória da proteína sericina pelo exercício de natação.

Já o DFN maiores de 4 μm apresentou diferença do CON para os demais grupos, não havendo diferença entre as menores, também não havendo diferença significativa no DAX, tanto maiores quanto menores. A EBM das fibras maiores de 4 μm mostrou diferença do CON, já nas menores não houve diferença, revelando pouca influência nessas variáveis, no oitavo dia.

Considerando que o processo inflamatório é fundamental para regeneração nervosa,²⁶ alguns estudos mostraram que a sericina foi responsável por indução de citocinas pró-inflamatórias e aumento da fagocitose, além de mostrar estimulação do fator de transcrição NF-Kb e p38 quinase, que estão amplamente envolvidos na regulação de vias pró-inflamatórias²⁹ e levando em consideração o estudo de Teodori et al.,⁵ que relatam o exercício de natação, na fase aguda da lesão nervosa periférica do nervo isquiático, por esmagamento, em ratos *Wistar*, acelera a regeneração nervosa e melhora a transmissão sináptica, existe a possibilidade de regulação da ação pró-inflamatória da proteína sericina pelo exercício de natação, quando observados os resultados da sua associação, necessitando estudos por tempo prolongado para analisar o comportamento desta relação em uma fase mais tardia do reparo nervoso.

Conclusão

A proteína sericina, aplicada diretamente sobre a lesão nervosa isquiática, apresentou características pró-inflamatórias. Já a natação isolada mostrou melhora da hipernocicepção em relação as demais intervenções, vinculado a um possível efeito aquático. Não houve sinais de aceleração do processo de reparo nervoso no oitavo dia após a lesão.

Referências

1. Brull R, Hadzic A, Reina MA, Barrington MJ. Pathophysiology and etiology of nerve injury following peripheral nerve blockade. *Reg Anesth Pain Med* 2015; 40(5):479-490.
2. Miranda GE, Torres RY. Epidemiology of traumatic peripheral nerve injuries evaluated with electrodiagnostic studies in a tertiary care hospital clinic. *P R Health Sci J* 2016; 35(2):76-80.
3. Savastano LE, Laurito SR, Fitt MR, Rasmussen JA, Polo VG, Patterson SI. Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. *Journal of Neuroscience Methods* 2014; 30(227):166-180.
4. Nijs J, Kosek E, Oosterwijck JV, Meeus M. Dysfunctional endogenous analgesia during exercise in patients with chronic pain: to exercise or not to exercise? *Pain Physician* 2012; 2012(15):205-213.
5. Teodori RM, Betini J, Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SYM, Montebelo MIL. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. *Neural Plasticity* 2011; 2011(1):1-8.
6. Jang S, Lee J. Effects of physical exercise on the functional recovery of rat hindlimbs with impairments of the sciatic nerve as assessed by 2D video analysis. *J Phys Ther Sci* 2015; 27(3):935-938.
7. Sarikcioglu L, Oguz N. Exercise training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. *Intern J Neuroscience* 2001; 109(1):173-171.

8. Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SYM, Betini J, Guirro RRJ, Somazz MC *et al.* Estimulación eléctrica y natación en la fase aguda de la axonotmesis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperación funcional. *Revista de Neurología* 2008; 47(1):11-15.
9. Dishman RK, Berthoud H, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR *et al.* *Neurobiology of exercise*. *Obesity* 2006; 14(3):345-356.
10. Coradini JG, Kakhata CMM, Kunz RI, Errero TK, Bonfleur ML, Bertolini GRF. Avaliação da força de preensão em ratos Wistar, normais e obesos, submetidos à natação com sobrecarga após compressão do nervo mediano. *Rev Bras Reumatol* 2015; 5(1):43-47.
11. Barajas-Gamboa JA, Serpa-Guerra AM, Restrepro-Osorio A, Álvarez-López C. Sericin applications: a globular silk protein. *Ingeniería y Competitividad* 2016; 18(2):193-206.
12. Dinescu S, Galateanu B, Albu M, Lungu A, Radu E, Hermenean A *et al.* Biocompatibility assessment of novel collagen-sericin scaffolds improved with hyaluronic acid and chondroitin sulfate for cartilage regeneration. *BioMed Research International* 2013; 2013(1):1-11.
13. Ersel M, Uyanikgil Y, Akarca FK, Ozcete E, Altunci YA, Karabey F *et al.* Effects of silk sericin on incision wound healing in a dorsal skin flap wound healing rat model. *Med Sci Monit* 2016; 22(1):1064-1078.
14. Aramwit P, Kanokpanont S, De-Eknamkul W, Srichana T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *J Biosci Bioeng* 2009; 107(5):556-561.
15. Padol AR, Jayakumar K, Mohan K, Manochaya S. Natural biomaterial silk and silk proteins: Applications in tissue repair. *International Journal of Materials and Biomaterials Applications* 2012; 2(4):19-24.
16. Wang Z, Wang J, Yang J, Luo Z, Yang W, Xie H *et al.* A neuroprotective sericin hydrogel as an effective neuronal cell carrier for the repair of ischemic stroke. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015; 7(44):1-34.
17. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA *et al.* Nerve crush injuries - A model for axonotmesis. *Experimental Neurology* 1994; 127(2):284-290.
18. Dias FJ, Issa JPM, Coutinho-Netto J, Fazan VPS, Sousa LG, Iyomasa MM *et al.* Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy and latex protein (*Hevea brasiliensis*) administration following a crush injury of the sciatic nerve in rats. *J Neurol Sci* 2015; 349(2015):129-137.
19. Gimenes ML, Silva VR, Vieira MGA, Silva MGC, Scheer AP. High molecular sericin from *Bombyx mori* coccons: Extraction and recovering by ultrafiltration. *International journal of Chemical Engineering and Applications* 2014; 5(3):226-271.

20. Peretti AL, Rosa CT, Errero TK, Baretta V, Schneider SCS, Bertolini GRF. Avaliação comportamental de ratos treinados em natação forçada. *Scientia Medica* 2015; 25(1):1-13.
21. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev Bras Fisioter* 2006; 10(1):113-119.
22. Vivancos GG, Verri Jr WA, Cunha TM, Schivo IRS, Parada CA, Cunha FQ *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J of Med Biol Res* 2004; 37(1):391-399.
23. Junqueira LC, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. 1th ed. São Paulo: Santos; 1983.
24. Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortop Bras* 2006; 14(6):220-225.
25. Mandelbaum-Livnat MM, Almog M, Nissan M, Loeb E, Shapira Y, Rochkind S. Photobiomodulation triple treatment in peripheral nerve injury: nerve and Muscle Response. *Photomed Laser Surg* 2016; 34(12):638-645.
26. Svehngisen AF, Dahlin LB. Repair of the peripheral nerve – Remyelination that Works. *Brain Sci* 2013; 3(3):1182-1197.
27. Lós DB, Silva IB, Lira KDS, Andrade RF, Moraes SRA. Efeito da natação na regeneração do nervo ciático após neurotmesa experimental. *Rev Fisioter S Fun* 2016; 5(1):23-29.
28. Kami K, Tajima F, Senba E. Exercise-induced hypoalgesia: potential mechanisms in animal models of neuropathic pain. *Anat Sci Int* 2016; 92(1):79-90.
29. Bhattacharjee M, Schultz-Thater E, Trella E, Miot S, Das S, Loparic M *et al.* The role of 3D structure and protein conformation on the innate and adaptive immune responses to silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2013; 34(33):8161-8171.
30. Liu H, Ge Z, Wang Y, Toh SL, Sutthikhum V, Goh JCH. Modification of sericin-free silk fibers for ligament tissue engineering application. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 82(1):129-138.

6 ARTIGO CIENTÍFICO 02

A PROTEÍNA DA SEDA SERICINA NO REPARO NERVOSO PERIFÉRICO ASSOCIADA AO EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO EM RATOS *WISTAR*

RESUMO

Introdução: Lesões no sistema nervoso periférico geram alterações na função motora voluntária, levando a incapacidades que implicam na diminuição da qualidade de vida e no aumento dos custos para o sistema de saúde público. Nesse sentido, é importante a indicação de terapias que acelerem o processo de regeneração, como os exercícios físicos. A natação, de modo específico, tem relevância na recuperação funcional. Ainda, diversos biomateriais vêm sendo investigados no auxílio da aceleração do processo regenerativo, e a proteína da seda sericina, apresenta um grande potencial, pois tem ação na regeneração tecidual e no processo de cicatrização.

Objetivo: Verificar a ação da sericina, associada ao exercício de natação com sobrecarga, no processo de reparo do nervo isquiático de ratos *Wistar* após compressão nervosa.

Métodos: 40 animais foram divididos em cinco grupos, sendo eles: controle (CON); lesão (LES); lesão-sericina (LSER); lesão-natação (LNAT) e; lesão-sericina-natação (LSRNT). Durante o procedimento de axoniotomese, foi aplicada diretamente sobre a lesão, a sericina na forma hidrolisada nos grupos LSER e LSRNT. Os grupos LNAT e LSRNT realizaram exercício de natação com sobrecarga progressiva de 10%, 15% e 20%, com progressão semanal, totalizando 3 semanas de natação, sendo avaliados quanto a função, nocicepção e alodinia. A eutanásia foi realizada no 22º dia de pós-operatório, e dois fragmentos do nervo foram coletados e preparados para análise descritiva e quantitativa. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente quanto sua normalidade e realizado ANOVA unidirecional, com pós-teste de LSD.

Resultados: A avaliação do índice funcional isquiático apresentou diferenças significativas da função motora do CON até o 14º dia, não mais apresentando tais diferenças no 21º e 22º dias. Com relação a hipernocicepção o teste de "Von Frey" digital revelou significativa melhora do desempenho do LNAT em relação ao LES, LSER e LSRNT, e o número de fibras nervosas viáveis e não viáveis menores de 4 µm de diâmetro, foram significativamente maiores no LSRNT que nos demais grupos.

Conclusão: A associação do tratamento de sericina e natação evidenciou efeito regulador da ação pró-inflamatória da sericina pelo exercício resistido de natação.

Palavras-chave: Biomateriais, Compressão nervosa, Exercícios em meio aquático, Proteína da seda.

ABSTRACT

Introduction: Injuries to the peripheral nervous system generate alterations in voluntary motor function, leading to impairments that imply the reduction of quality of life and increased costs for the public health system. In this sense, it is important to indicate therapies that accelerate the regeneration process, such as physical exercises. Specifically, swimming has relevance in functional recovery. In addition,

several biomaterials have been investigated to aid in the acceleration of the regenerative process, and the sericin silk protein has great potential because it has an action on tissue regeneration and healing process.

Objective: To verify the action of sericin, associated to the overloaded swimming exercise, on the regeneration process of the sciatic nerve of Wistar rats after 22 days of nerve compression.

Methods: 40 animals were divided into five groups, being: control (CON); injury (LES); injury-sericin (LSER); injury-swimming (LNAT) and; injury-sericin-swimming (LSRNT). During the axoniotomy procedure, the sericin in hydrolyzed form was applied directly to the lesion in the LSER and LSRNT groups. The LNAT and LSRNT groups underwent a 10%, 15% and 20% progressive overload swimming exercise, with weekly progression, totaling 3 weeks of swimming, being evaluated for function, nociception and allodynia. Euthanasia was performed on the 22^o postoperative day, and two fragments of the nerve were collected and prepared for descriptive and quantitative analysis. The results obtained were statistically analyzed as to their normality and performed unidirectional ANOVA, with post-test of LSD.

Results: The sciatic functional index assessment showed significant differences in the motor function of the CON until the 14th day, no longer presenting such differences in the 21st and 22nd days. Regarding the allodynia, the digital "Von Frey" test revealed a significant improvement in LNAT performance in relation to LES, LSER and LSRNT, and the number of viable and non-viable nerve fibers smaller than 4 μm in diameter were significantly higher in the LSRNT than in the other groups.

Conclusion: The combination of sericin treatment and swimming showed regulating effect of the sericin pro-inflammatory action by swimming resistance exercise.

Key words: Biomaterials, Nerve compression, Exercises in the aquatic environment, Silk Protein.

INTRODUÇÃO

Lesões no sistema nervoso periférico são frequentes, o que implica em alterações na função motora voluntária, levando a morbidades, incapacidades nas atividades de vida diária e laborais, ao déficit sensorial, à dor crônica e à atrofia muscular. O tratamento geralmente é longo, com consequente aumento dos custos para os sistemas de saúde públicos e previdenciário (BRULL et al., 2015; HUANG et al., 2012; SIQUEIRA, 2007; SOUZA; KRAYCHETE, 2014). Também causam relevante impacto socioeconômico, pois a faixa etária de maior incidência é a de adultos jovens (MIRANDA; TORRES, 2016; SAADAT; ESLAMI; RAHIMI-MOVAGHAR, 2011).

Diversas abordagens terapêuticas são utilizadas no tratamento de lesões nervosas periféricas (LNPs) (SAVASTANO et al., 2014), como o repouso inicial, as

terapias medicamentosas, as intervenções cirúrgicas e as não cirúrgicas, como é o caso dos exercícios físicos (VALAT et al., 2010). Nesse sentido, estudos demonstram benefícios do exercício físico na regeneração nervosa periférica, com aumento de força, de resistência e de mobilidade (NIJ et al., 2012; TEODORI et al. 2011), além da melhora na mielinização e desenvolvimento das fibras nervosas (JANG e LEE, 2015).

Entre as modalidades de exercício físico, o realizado em ambiente aquático, apresenta resultados favoráveis, revelando efeitos benéficos vasculares (CHINKIN, 2013; RITTER et al., 2012; SILVA et al., 2011), melhora na recuperação funcional após lesão nervosa (JANG; LEE, 2015; POSSAMAI; SIEPKO; ANDRÉ, 2010; TEODORI et al., 2011), favorece a remoção de mielina degenerada (SARIKCIOGLU; OGUZ, 2001), traz benefícios à recuperação do diâmetro axonal (OLIVEIRA et al., 2008), além de estimular o crescimento e o desenvolvimento de novas células e aumentar a produção de fatores de crescimento neuronais (DISHMAN et al., 2006). Ainda, Teodori et al. (2011) relatam que a natação aplicada nas fases agudas e tardias, em modelos de compressão nervosa, promove aceleração do processo de regeneração do nervo isquiático.

Contudo, outros estudos demonstraram atrasos na recuperação funcional com esse tipo de exercício (OLIVEIRA et al., 2008), sem efeito sobre a força muscular (CORADÍNI et al., 2015). Além disso, podem ser observados diversos problemas durante o processo de reparo nervoso, podendo apresentar déficits como a reinserção nervosa inadequada levando à ineficiência da função nervosa, gerando impactos diretos no resultado final (BRULL et al., 2015; HUANG et al., 2012; POSSAMAI; SIEPKO; ANDRÉ, 2010). Isso faz com que seja necessário, investigar de forma mais ampla o efeito do exercício físico no reparo nervoso e a possibilidade de associação ao tratamento de substâncias bioativas, que possam auxiliar o processo regenerativo.

Observadas possibilidades de associação ao exercício físico, o biopolímero proteico da seda, sericina, apresenta potencial uso em biomedicina (BARAJAS-GAMBOA et al., 2016; HASSIBA et al., 2016). Essa proteína é produzida pela lagarta bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e, juntamente com a fibroína, são utilizadas na construção do casulo de seda (MONDAL; TRIVEDY; NIRMAL-KUMAR, 2007). Estudos demonstraram a influência da sericina na regeneração de tecido

cartilaginosa, favorecendo a proliferação celular (DINESCU et al., 2013), a aceleração da regeneração de tecido cutâneo (ARAMWIT et al., 2013; ERSEL et al., 2016), a atuação no processo de cicatrização e levando a menores níveis de mediadores inflamatórios (ARAMWIT et al., 2009; PADOL et al., 2012).

Quando considerados estudos da sericina em tecido nervoso, Wang et al. (2015) demonstraram que a sericina obteve efeito neuroprotetor, promovendo o crescimento *in vitro* de neurônios. Além desses, outros potenciais efeitos, como antioxidante na aplicação na indústria de alimentos e cosméticos, agente terapêutico na cicatrização de feridas, estimulação da proliferação celular, além de efeitos como agente antitumoral, antimicrobiano e anti-inflamatório estão sendo estudados. Tais estudos têm tornado a sericina foco de interesse em diversos segmentos no intuito de delimitar as possibilidades do seu uso (KUNZ et al., 2016).

Sendo assim, a sericina se apresenta como um biomaterial com diversas possibilidades de aplicações, podendo ter efeito no reparo de LNP e, com isso, este estudo objetivou verificar a ação da sericina, associada ao exercício de natação com sobrecarga, sobre o reparo do nervo isquiático em ratos *Wistar*, após compressão nervosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da amostra

A pesquisa, desenvolvida no Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos (LELRF) em conjunto com o Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), seguiu todos os procedimentos experimentais, e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA). Foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar*, com 8 ± 2 semanas de idade e peso de $268,75 \pm 35,05$ gramas, mantidos em ambiente controlado, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura em $25 \pm 1^\circ\text{C}$, água e ração *ad libitum*. Esses animais foram separados, em cinco grupos: controle (CON), não realizou nenhum tipo de procedimento; lesão (LES) passou por protocolo de lesão nervosa isquiática e não recebeu nenhum tipo de tratamento; lesão-sericina (LSER), passou por protocolo de lesão nervosa isquiática e foi tratado por aplicação da proteína sericina

hidrolisada diretamente no local da lesão, no momento do procedimento cirúrgico; lesão-natação (LNAT), submetido à lesão nervosa isquiática e tratamento por protocolo específico de natação; e lesão-sericina-natação (LSRNT), submetido ao protocolo de lesão nervosa, tratamento de proteína sericina, e posteriormente natação.

Todos os animais foram submetidos às mesmas avaliações ao longo do período experimental. Os animais de CON, LES e LSER, não realizaram o protocolo de exercício por natação, porém foram submetidos ao ambiente aquático por 10 segundos, nos mesmos dias do treino estabelecido para LNAT e LSRNT, simulando o estresse do ambiente aquático (PERETTI et al., 2015).

Lesão nervosa isquiática e aplicação da proteína sericina

Antecedendo ao procedimento cirúrgico, os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina (95 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (12 mg/Kg) via intraperitoneal. Na sequência, o animal foi posicionado em decúbito ventral, com abdução dos quatro membros, e preparada a região cirúrgica do membro pélvico direito. A incisão foi realizada paralelamente às fibras musculares do músculo bíceps femoral, possibilitando a exposição do nervo isquiático. Posteriormente, com auxílio de uma pinça hemostática, o nervo isquiático foi comprimido durante 30 segundos, utilizando-se como referência de pressão, o segundo dente da cremalheira (Bridge et al., 1994). Em seguida, foi realizada uma sutura epineural na região lesionada, com fio de nylon 10.0, possibilitando a localização exata da lesão e coleta dos segmentos do nervo no momento da eutanásia (SAVASTANO et al., 2014).

Após isso, os animais de LSER e LSRNT receberam a aplicação de 100 µL de sericina hidrolisada, por animal, na forma de uma única aplicação, com o auxílio de uma seringa dosadora, quantidade suficiente para recobrir toda a área lesionada (DIAS et al., 2015). Em seguida, foi realizado o fechamento cirúrgico por camadas, e a realocação dos animais nas mesmas condições pré-cirúrgicas.

A sericina foi obtida diretamente de casulos de *B. mori*, fornecidos pela indústria sericícola BRATAC Silk do Brasil (Londrina, Paraná, Brasil). Os casulos foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1 cm² e submetidos ao

processo de extração por alta pressão e alta temperatura em autoclave (CS 30 – Primatec, Itu, SP, Brasil), a 120° C e pressão de 1 kgf/cm², por 1 hora (GIMENES et al., 2014). Não houve adição de produtos químicos durante a extração e foi utilizado 100 mL de água destilada para cada 6 g de casulo. A fibroína foi separada utilizando-se uma peneira de 18 malhas, a solução de sericina foi congelada (-20°C) e utilizada na forma hidrolisada durante o experimento.

Natação

O exercício de natação foi realizado com sobrecarga de 10% do peso corporal do animal, com ciclos de cinco dias por semana de exercício, com evolução progressiva do tempo de natação, tendo duração de 15 minutos no primeiro ciclo, 20 minutos no segundo e 25 minutos no terceiro ciclo. A carga foi composta por pesos de chumbo, fixados na região abdominal por meio de fita de velcro, visando a não interferir na mobilidade do animal durante o exercício. O protocolo iniciou no terceiro dia após o procedimento cirúrgico, mantido cada ciclo de cinco dias consecutivos de exercício de natação e dois dias de intervalo, sendo realizada a eutanásia dos animais no 22º dia após o procedimento cirúrgico. A carga foi determinada diariamente pela pesagem prévia dos animais.

Nos dez dias que antecederam ao procedimento cirúrgico, os animais foram habituados ao protocolo de natação e aos testes. Para a realização do exercício, foi utilizado um tanque oval, com 60 cm de profundidade e capacidade para 200 L, e com nível de água em 40 cm de profundidade e temperatura mantida em 32 ± 1°C.

Índice funcional do isquiático

Foi utilizada uma esteira com base em acrílico (Insight Instrumentos® - Ribeirão Preto – São Paulo - Brasil) acoplada a um sistema de captura de imagens (câmera Philips® webcam SPC230NC usb CCD), a qual obteve dados das pegadas dos animais. Foram observadas medidas como: o comprimento da pata (distância entre os dois pontos extremos da pegada longitudinalmente); do espalhar total dos dedos (distância entre os dois pontos mais extremos da pegada transversalmente); espalhar dos dedos intermediários, medindo a distância entre estes, tanto do lado

experimental, afetado pela lesão isquiática, quanto do contralateral. Os valores foram submetidos à fórmula específica (Fig. 01), apresentados em percentual negativo, sendo 0 (zero) representativo de função normal e -100 (menos 100) representativo de perda total da função (MONTE-RASO et al., 2010).

$$SFI = \left[\frac{(ETOF - NTOF)}{NTOF} + \frac{(NPL - EPL)}{EPL} + \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + \frac{(EIT - NIT)}{NIT} \right] * \frac{220}{4}$$

Figura 01: Fórmula utilizada para cálculo do Índice Funcional do Isquiático, sendo: E= experimental; TOF= distancia de uma pata a outra; PL= comprimento da pata; TS= espalhar total dos dedos; IT= espalhar dos dedos intermediários. (Adaptado de Monte-Raso et al., 2010).

Teste tipo filamento de “Von Frey” Digital

O analgesímetro digital tipo filamento de “Von Frey” (Insight Instrumentos® - Ribeirão Preto – São Paulo - Brasil), consistiu na aplicação de um filamento metálico na região do procedimento cirúrgico, com o animal contido, sendo posicionada uma ponteira de polipropileno do filamento, perpendicularmente à área, com aumento gradativo da pressão exercida até que o animal realizasse o movimento de retirada do membro pélvico. Em seguida foi realizado o mesmo estímulo na face plantar do membro pélvico direito, com o animal em uma caixa elevada com piso de tela, possibilitando o acesso e posicionamento perpendicular e o aumento gradativo da pressão do filamento, sendo interrompido o teste assim que o animal elevasse o membro, ficando registrado o valor da força necessária para retirada. Foram realizadas três medidas por avaliação, em cada região, e adotada a média entre elas para análise estatística (VIVANCOS et al., 2004).

Além disso, foram realizadas oito avaliações (Tab. 01), sendo que a ordem de execução dos testes foi estabelecida e seguida durante todo o experimento, mesmo durante a fase de adaptação, sendo primeiro realizado o teste do IFC, em seguida o teste com analgesímetro digital tipo filamento de “Von Frey”, porém a ordem de realização dos grupos foi randomizada a fim de diluir a influência do tempo e fadiga dos avaliadores durante os testes.

Tabela 01 – Cronograma de avaliações

Cronograma de avaliações		
Avaliação	Descrição	Dia/procedimento
AV1	Antes da lesão	24 horas antes do procedimento cirúrgico
AV2	Antes da natação	No 3º dia do pós-operatório
AV3	Após a natação	No 3º dia do pós-operatório
AV4	Após a natação	No 7º dia do pós-operatório
AV5	Após 24h de repouso	No 8º dia de pós-operatório
AV6	Após a natação	No 14º dia do pós-operatório
AV7	Após a natação	No 21º dia do pós-operatório
AV8	Antes da eutanásia	No 22º dia do pós-operatório

Coleta e eutanásia

No 22º dia após o procedimento de lesão nervosa, os animais foram pesados e anestesiados, o nervo isquiático direito foi coletado e seccionado no sentido distal em dois fragmentos de 1 cm cada. O primeiro (fragmento proximal) foi obtido imediatamente após o ponto de lesão, identificado pelo fio de nylon 10.0, e o segundo (fragmento distal) foi coletado na sequência. Após esse procedimento, os animais ainda sob o efeito do anestésico foram eutanasiados.

Análise morfológica

Os fragmentos do nervo isquiático foram fixados em paraformaldeído tamponado, por 24 horas, sendo que o fragmento distal foi pré-corado com tetróxido de ósmio 2%. Posteriormente, foram processados para emblocamento em parafina histológica e cortados transversalmente em 5 µm de espessura. As lâminas obtidas do fragmento proximal foram coradas em hematoxilina e eosina (H/E) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), para as análises descritivas do nervo, enquanto o distal foi submetido às análises morfométricas. Para tanto, as lâminas foram fotomicrografadas em microscópio Olympus BX 50. Para as análises morfométricas utilizou-se o programa Image-Pro-Plus 6.0, tendo a área total de cada quadrante aproximadamente 13650 µm², em que foram observados os seguintes parâmetros: quantidade total de fibras nervosas viáveis (FNV), quantidade total de fibras

nervosas não viáveis (FNNV), diâmetro do axônio (DAX), diâmetro da fibra nervosa (DFN), e espessura da bainha de mielina (EBM), sendo consideradas FNNV, aquelas que não apresentassem contornos definidos, passíveis de mensuração. As fibras nervosas foram analisadas com relação ao diâmetro, em menores e maiores que 4 μm (MANDELBAUM-LIVNAT et al., 2016). Foram efetuadas quatro imagens de cada corte, sendo quadrante superior esquerdo, superior direito, inferior esquerdo e inferior direito, em aumento de 1.000 vezes. A análise foi feita de forma cega com relação aos grupos, em que se analisou 25 fibras maiores e 25 menores de 4 μm de diâmetro, por quadrante, totalizando 200 fibras por nervo, ou até sua totalidade.

Análise estatística

Os resultados foram expressos por meio de estatística descritiva e analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Verificada a normalidade dos dados, procedeu-se a análise por Anova unidirecional, com pós-teste de LSD (teste t), sendo o nível de significância aceito de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Índice funcional do isquiático

Na comparação individual dos grupos, o CON não demonstrou diferenças estatísticas significativas ($p=0,599$). A AV1, realizada previamente à lesão, revelou comportamento idêntico em todos os grupos com intervenção, apresentando diferença significativa em comparação com as demais avaliações. O LES apresentou diferença significativa da AV7 para AV2, AV4, AV5, AV6 ($p=0,0224$, $p=0,092$, $p=0,025$, $p=0,002$ respectivamente) e AV6 para AV8 ($p=0,021$). Já o grupo LSER, a AV7 apresentou diferença das AV2 ($p=0,019$), AV3 ($p=0,019$), AV4 ($p=0,043$), AV5 ($p=0,013$) e AV6 ($p=0,014$), o mesmo comportamento observado na AV8 mostrando diferença da AV2 ($p=0,014$), AV3 ($p=0,013$), AV4 ($p=0,031$), AV5 ($p=0,009$) e AV6 ($p=0,010$). O grupo LNAT apresentou diferença da AV8 para as AV4 ($p=0,034$), AV5 ($p=0,045$) e AV6 ($p=0,020$). O LSRNT apresentou comportamento similar havendo diferença da AV7 para AV2 ($p=0,002$), AV3

($p=0,014$), AV4 ($p=0,009$), AV5 ($p=0,010$) e AV6 ($p<0,001$), e da AV8 para AV2 ($p=0,033$) e AV6 ($p=0,002$).

Na comparação entre os grupos, no momento das avaliações, na AV1 não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,741$). Já no momento das AV2, AV3, AV4, AV5 e AV6, os grupos se comportaram de forma idêntica, observadas diferenças significativas somente entre o CON e todos os demais grupos ($p<0,001$). A comparação do momento da AV7 e AV8 não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,387$ e $p=0,330$ respectivamente), sugerindo que nesses momentos não houve diferença funcional entre os grupos observados, mesmo quando comparados ao CON. (Tab. 02)

Tabela 02 – Média e desvio padrão do Índice Funcional Isquiático, referente ao 22º dia e diferenças estatísticas significativas

	CON	LES	LSER	LNAT	LSRNT
AV1	6,40±29,77 ^{aA}	-2,48±14,57 ^{aA}	-2,03±18,79 ^{aA}	-7,31±12,93 ^{aA}	-3,10±18,62 ^{aA}
AV2	-18,97±17,89 ^{aA}	-65,18±13,64 ^{cdB}	-66,06±15,58 ^{dB}	-63,11±25,09 ^{bcB}	-62,33±16,91 ^{bb}
AV3	-7,25±31,91 ^{aA}	-58,05±26,24 ^{bcB}	-66,31±22,79 ^{dB}	-58,75±25,56 ^{bcB}	-47,23±36,20 ^{bb}
AV4	-5,38±22,22 ^{aA}	-60,54±15,34 ^{cdB}	-61,56±18,75 ^{dB}	-65,64±22,93 ^{ceB}	-55,64±17,80 ^{bb}
AV5	0,37±19,62 ^{aA}	-64,53±13,20 ^{cdB}	-68,24±13,11 ^{dB}	-64,08±19,54 ^{ceB}	-55,61±25,82 ^{bb}
AV6	-1,52±21,26 ^{aA}	-76,04±4,20 ^{cb}	-67,62±14,93 ^{dB}	-68,34±17,58 ^{cb}	-73,50±23,31 ^{bdB}
AV7	-9,60±12,72 ^{aA}	-33,28±33,61 ^{ba}	-33,45±43,93 ^{bcA}	-43,30±26,62 ^{beA}	-24,12±29,14 ^{ea}
AV8	-11,24±24,10 ^{aA}	-43,99±41,11 ^{bdA}	-31,59±36,75 ^{ca}	-39,19±27,46 ^{ba}	-36,67±17,85 ^{ea}

Obs.: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa no grupo quando comparado suas avaliações (coluna), letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos no momento da avaliação (linha).

Teste de “Von Frey” na cicatriz cirúrgica e na fáscia plantar

No teste de filamento tipo “Von Frey” digital, na região da cicatriz cirúrgica, o CON não demonstrou diferenças significativas entre as oito avaliações realizadas ($p=0,51$). Já os demais grupos (LES, LSER, LNAT e LSRNT), com relação à AV1, realizada previamente a lesão, mostrou diferença significativa em relação as demais avaliações, mantendo $p<0,001$ em todos os grupos. Além disso, o LES mostrou a AV7 diferente da AV2 ($p=0,005$) e da AV5 ($p=0,017$), e a AV8 se mostrou diferente das AV2 ($p<0,001$), AV3 ($p=0,012$), AV4 ($p=0,006$), AV5 ($p<0,001$) e AV6 ($p=0,014$). O grupo LSER apresentou diferença da AV2 para AV4 ($p=0,021$), AV5 ($p=0,026$), AV6 ($p=0,018$), AV7 ($p<0,001$), AV8 ($p=0,008$), e da AV3 para AV4 ($p=0,018$). O

grupo LNAT obteve diferença da AV2 para AV5 ($p=0,043$), AV6 ($p=0,003$), AV7 ($p<0,001$), AV8 ($p<0,001$), a AV3 foi diferente da AV6 ($p=0,041$), AV7 ($p<0,001$), AV8 ($p<0,001$), a AV4 também foi significativamente diferente da AV7 ($p<0,001$) e AV8 ($p=0,001$), AV5 também da AV7 ($p=0,003$) e AV8 ($p=0,007$), e AV6 diferente da AV7 ($p=0,044$). Já o LSRNT apresentou diferença da AV2 ($p<0,001$), e a AV3 foi diferente da AV4 ($p=0,024$), AV5 ($p=0,009$), AV6 ($p=0,004$), AV7 ($p<0,001$) e AV8 ($p<0,001$) (Tab. 03).

Na comparação entre os grupos no momento das avaliações da cicatriz cirúrgica, não houve diferença significativa entre a AV1 dos grupos observados ($p=0,580$). Já no momento de AV2, AV3, AV4, AV5, AV6, AV7 e AV8 houve diferenças significativas entre CON e todos os demais grupos ($p<0,001$). Além destes, na comparação do momento da AV6 foi observado diferença significativa entre o LSER e o LNAT ($P=0,040$), no momento da AV7 de LNAT para LES ($p=0,012$) e de LNAT para LSRNT ($p=0,037$), e durante AV8 observou-se diferença entre LNAT e LSER ($p=0,013$).

Na região da fásia plantar, no teste de filamento tipo “*Von Frey*” digital, o CON não demonstrou diferenças significativas entre as avaliações realizadas ($p=0,950$). Já o LES, LNAT, LSER e LSRNT apresentou diferença estatística da AV1 para todas as demais avaliações, sendo $p<0,001$ constante em todos os grupos. Ainda o LES apresentou diferença da AV8 para AV2 ($p=0,003$), AV3 ($p=0,007$), AV5 ($p=0,003$) e AV6 ($p=0,041$), bem como da AV6 para AV7 ($p=0,041$). O LSER com diferença da AV8 para AV2 ($p=0,024$), AV3 ($p=0,036$), AV6 ($p=0,026$). No LNAT foram observadas diferenças entre AV2 para AV4 ($p=0,018$), AV5 ($p<0,001$), AV6 ($p<0,001$), AV7 ($p<0,001$) e AV8 ($p<0,001$), da AV3 para as AV5 ($p=0,006$), AV6 ($p<0,001$), AV7 ($p<0,001$) e AV8 ($p<0,001$), da AV4 para as AV6 ($p=0,005$), AV7 ($p=0,001$) e AV8 ($p<0,001$) e de AV5 para AV8 ($p<0,016$). Já o LSRNT apresentou diferença da AV2 para AV4 ($p<0,001$), AV5 ($p=0,041$), AV6 ($p=0,001$), AV7 ($p<0,001$) e AV8 ($p<0,001$), e da AV7 para AV3 ($p<0,001$), AV4 ($p=0,007$), AV5 ($p<0,001$) e AV6 ($p=0,004$), e da AV8 para AV3 ($p<0,001$), AV4 ($p<0,001$), AV5 ($p<0,001$) e AV6 ($p<0,001$).

Na comparação entre os grupos da fásia plantar, não houve diferença no momento da AV1 ($p=0,597$). Já no momento da AV2, AV3, AV4, AV5, AV6, AV7 e AV8 foram observadas diferenças significativas entre CON e todos os demais

grupos ($p < 0,001$). Ainda no momento de AV6, foi observada diferença entre o grupo LNAT e os grupos LES ($p = 0,001$), LSER ($p < 0,001$) e LSRNT ($p = 0,024$) (Tab. 03).

Tabela 03 – Média e desvio padrão do teste de “Von Frey” da cicatriz cirúrgica e fásia plantar, referente ao 22^o dia e diferenças estatísticas significativas.

		CON	LES	LSER	LNAT	LSRNT
Cicatriz Cirúrgica	AV1	140,96±15,82 ^{aA}	132,20±5,73 ^{aA}	137,70±14,59 ^{aA}	132,65±7,69 ^{aA}	137,15±7,69 ^{aA}
	AV2	138,25±19,85 ^{aA}	49,26±9,61 ^{dB}	49,69±5,41 ^{bB}	42,37±21,68 ^{dB}	30,43±6,36 ^{bB}
	AV3	136,37±16,13 ^{aA}	55,53±7,79 ^{dcB}	49,32±8,45 ^{bB}	49,90±14,81 ^{deE}	46,14±12,91 ^{cB}
	AV4	145,46±13,90 ^{aA}	54,47±8,43 ^{dcB}	61,62±5,72 ^{cB}	53,30±7,24 ^{dfB}	56,00±6,30 ^{dB}
	AV5	141,86±12,92 ^{aA}	51,23±9,23 ^{dB}	61,18±7,61 ^{cB}	58,49±9,22 ^{efB}	57,63±7,08 ^{dB}
	AV6	151,13±8,96 ^{aA}	55,74±8,57 ^{dcB}	61,97±9,64 ^{cB}	66,13±7,73 ^{fC}	58,86±8,41 ^{deBC}
	AV7	142,20±16,81 ^{aA}	62,40±4,92 ^{bccC}	68,44±9,26 ^{cBC}	82,16±20,45 ^{bB}	66,68±6,94 ^{efC}
	AV8	151,08±12,22 ^{aA}	67,29±6,70 ^{bBC}	63,59±11,16 ^{cB}	80,03±17,96 ^{bccC}	67,35±5,59 ^{efBC}
Fásia Plantar	AV1	71,29±15,34 ^{aA}	65,53±4,97 ^{aA}	63,91±12,77 ^{aA}	65,51±5,27 ^{aA}	62,41±9,88 ^{aA}
	AV2	71,02±16,17 ^{aA}	30,80±7,57 ^{bdB}	29,87±11,17 ^{cB}	20,43±8,32 ^{cB}	22,79±4,72 ^{cB}
	AV3	67,22±10,19 ^{aA}	31,94±6,81 ^{bdB}	29,72±11,46 ^{cB}	24,32±7,11 ^{cdB}	28,28±2,64 ^{cdB}
	AV4	67,59±8,63 ^{aA}	36,29±6,20 ^{bcB}	36,47±9,68 ^{cB}	29,02±6,96 ^{deB}	33,85±4,35 ^{dB}
	AV5	65,39±8,44 ^{aA}	31,00±3,49 ^{bdB}	32,07±3,40 ^{cB}	34,40±7,41 ^{eB}	29,14±7,61 ^{dB}
	AV6	69,81±6,38 ^{aA}	29,85±4,65 ^{bB}	29,05±3,04 ^{cB}	39,19±3,74 ^{bC}	33,29±4,70 ^{dB}
	AV7	70,60±5,49 ^{aA}	37,70±9,62 ^{cdB}	34,77±8,10 ^{bcB}	40,75±7,21 ^{bB}	45,36±4,39 ^{bB}
	AV8	70,67±8,68 ^{aA}	42,44±6,17 ^{cB}	40,36±9,18 ^{bB}	43,14±5,49 ^{bB}	44,49±3,65 ^{bB}

Obs.: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa no grupo quando comparado suas avaliações (coluna), letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos no momento da avaliação (linha).

Análise morfológica

O nervo isquiático do CON revelou características teciduais e celulares normais, formado por fibras nervosas de diferentes diâmetros, mielínicas e amielínicas, e presença das células de Schwann (Fig. 2-A). As bainhas conjuntivas, endoneuro, perineuro e epineuro também estavam presentes e vasos sanguíneos de número e aspecto normais. Os tecidos dos nervos isquiáticos do grupo LES se apresenta com presença de infiltrado inflamatório, presença de células gigantes inflamatórias multinucleadas, lesão axonal extensa e vasos sanguíneos.

Em LSER evidenciou-se a presença de células de Schwann, infiltrado inflamatório, linfócitos, com grande número de fibras degeneradas e de menor diâmetro, com aumento do espaço na matriz extracelular. Houve presença de células gigantes inflamatórias multinucleadas, lesão extensa e degeneração axonal.

O LNAT apresentou pouco infiltrado inflamatório, sendo que esta quase todo regenerado, com boa aparência geral. Similar ao observado em LSRNT, porém este

se encontra de forma geral melhor que os grupos de tratamento isolados, com poucos pontos de lesão, sendo o epineuro e a bainha de mielina mais organizados, mas com axônios e bainha de aparente menor diâmetro.

Com relação à análise quantitativa, todas as variáveis de fibras maiores que 4 μm de diâmetro, revelaram diferenças do CON para os demais grupos, com $p < 0,001$ constante. Ainda na contagem do número total de FNV, na somatória dos quatro quadrantes, das fibras de diâmetro maior de 4 μm , mostraram diferença do grupo LES para o LNAT ($p=0,005$) e para o LSRNT ($p=0,004$). Já os valores de FNV menores que 4 μm revelaram diferenças do LNAT para o CON ($p=0,040$), e LES ($p=0,020$) e do grupo LSRNT para o CON ($p < 0,001$), LES ($p < 0,001$) e LSER ($p=0,002$). Já em relação as FNNV com maiores que 4 μm , mostrou diferença do LES e LSER ($p=0,035$). Na variável FNNV menores que 4 μm , foram observadas diferenças entre CON e todos os demais grupos ($p < 0,001$), e de LSRNT para LES ($p < 0,001$) e LNAT ($p < 0,001$). Na análise da média dos DFN menores que 4 μm , não houve diferença ($p=0,863$). Já com relação ao DAX das fibras maiores, observou-se diferença do LES para LSER ($p=0,039$) e LNAT ($p=0,036$). Já a média dos DAX menores que 4 μm não mostrou diferença estatística significativa ($p=0,081$). Na avaliação da média da EBM de fibras nervosas menores de 4 μm , não houve diferença significativa ($p=0,057$) (Tab. 04).

Tabela 04 – Comparativo das médias, maiores e menores de 4 μm , no 22º de pós-operatório, de fibras nervosas viáveis (FNV), fibras nervosas não viáveis (FNNV), diâmetro das fibras nervosas (DFN), diâmetro dos axônios (DAX) e espessura da bainha de mielina (EBM).

		CON	LES	SER	LNAT	LSRNT
FNV	> 4 μm	578,00±58,03 ^A	18,83±12,82 ^B	82,66±70,13 ^{CB}	135,33±115,55 ^C	101,83±85,02 ^{CB}
	< 4 μm	36±16,30 ^B	28,16±22,73 ^B	46,5±23,53 ^{BC}	87,16±26,67 ^C	126,66±80,05 ^A
FNNV	> 4 μm	20,50±3,08 ^A	394,83±78,77 ^B	508,00±113,59 ^C	437,16±86,42 ^{BC}	495,83±110,96 ^{BC}
	< 4 μm	0,00±0,00 ^A	222,83±98,31 ^C	227,16±95,00 ^{BC}	333,33±122,81 ^C	439,83±119,84 ^B
DFN	> 4 μm	9,23±0,31 ^A	4,82±0,19 ^B	5,31±1,07 ^B	5,35±1,25 ^B	4,51±0,15 ^B
	< 4 μm	3,42±0,14 ^A	3,42±0,12 ^A	3,41±0,13 ^A	3,39±0,09 ^A	3,47±0,15 ^A
DAX	> 4 μm	4,39±0,15 ^A	2,30±0,22 ^B	2,79±0,57 ^C	2,80±0,58 ^C	2,41±0,12 ^C
	< 4 μm	1,56±0,08 ^A	1,53±0,09 ^A	1,7±0,06 ^A	1,81±0,43 ^A	1,80±0,12 ^A
EBM	> 4 μm	2,41±0,14 ^A	1,25±0,13 ^B	1,25±0,29 ^B	1,27±0,34 ^B	1,04±0,05 ^B
	< 4 μm	0,93±0,04 ^A	0,94±0,06 ^A	0,86±0,05 ^A	0,78±0,19 ^A	0,83±0,05 ^A

Obs. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos (linha).

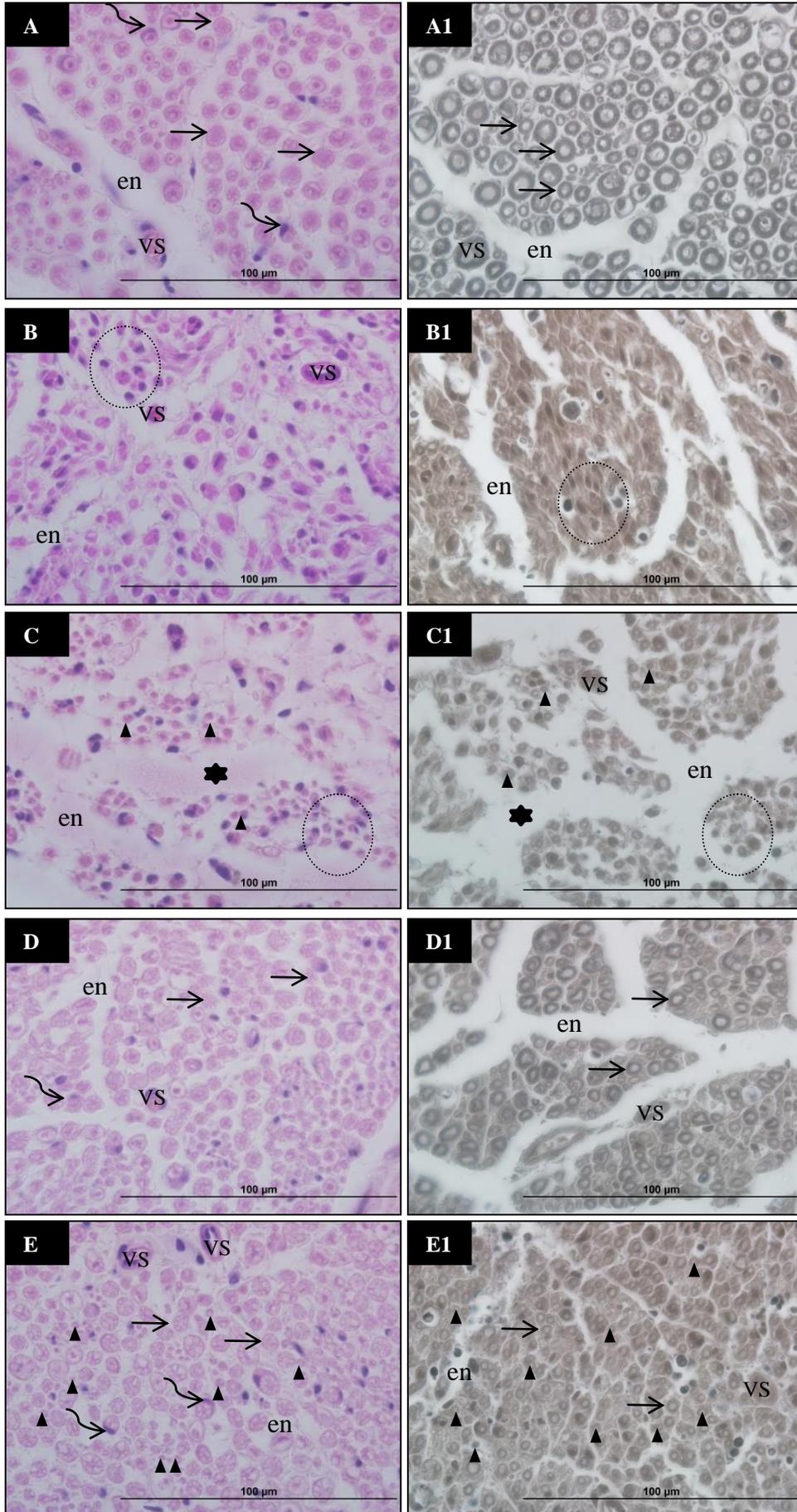


Figura 02 - Fotomicrografias do nervo isquiático de ratos *Wistar*, em corte transversal, na coloração hematoxilina-eosina na primeira coluna e tetróxido de ósmio na segunda coluna no 22º dia após procedimento cirúrgico. Em **A**, imagem representativa do grupo Controle, apresentando fibras nervosas íntegras, com axônio e bainha de mielina (seta fina), núcleos de células de Schwann (seta curva), vaso sanguíneo (vs) e endoneuro (en). Em **B**, imagem representativa do grupo Lesão, células de Schwann, infiltrado inflamatório (círculo pontilhado), vasos sanguíneos, possível região com infiltrado inflamatório (círculo) e fibras degeneradas. Em **C**, imagem representativa do grupo Sericina, apresentando grande espaço na matriz extracelular (asterisco), porém com mais organização tecidual. Em **D**, imagem representativa do grupo Natação, apresentando uniformidade e organização tecidual com evidências de reparo, apresentando fibras nervosas íntegras, maiores e menores (ponta de seta). Em **E**, imagem do grupo Sericina-Natação, fibras nervosas íntegras e de menor diâmetro, células de Schwann e vasos sanguíneos, com boa organização tecidual geral e apresentando sinais de reparo.

DISCUSSÃO

A localização periférica do nervo isquiático o expõe comumente a lesões nervosas dos membros inferiores, decorrentes de traumatismos abertos ou fechados, interferindo na transmissão dos impulsos nervosos e podendo implicar em incapacidade funcional significativa, com potencial impacto socioeconômico negativo, afetando sobretudo, indivíduos jovens e produtivos (MIRANDA; TORRES, 2016; SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013), Diante disso, são relevantes os estudos nesse campo científico, e ainda, a investigação da associação da proteína sericina com o exercício de natação, até esse momento não abordada na literatura.

O modelo de lesão abordado nesta pesquisa foi proposto por Bridge et al. (1994), produzindo uma compressão, em que ocorre rompimento de axônios, e desencadeia um processo denominado degeneração Walleriana, no sentido distal à lesão, o qual ocorreu em todos os grupos lesionados (LES, LSER, LNAT e LSRNT), comprovado pelas análises morfológica descritiva e quantitativa, e pela perda significativa da função motora após a compressão nervosa em todos os animais avaliados.

Esse processo afeta todas as estruturas das fibras nervosas em um espaço de cerca de dois a três dias (CAMPBELL, 2008; NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007; SIQUEIRA, 2007), sendo que a cascata de eventos disparada a partir da lesão envolve, entre outros fatores, a migração de macrófagos, a proliferação de células de Schwann, as mudanças nos constituintes da matriz extracelular com reorganização do espaço endoneural, como verificado no presente estudo, além da produção de citocinas e aumento de neurotrofinas (DUBOVÝ, 2011).

A hipercelularidade nos grupos lesionados resulta da mobilização de diversos tipos celulares voltados à reorganização tecidual e funcional. Macrófagos, presentes no coto distal, removem os restos mielínicos em degeneração, entre o segundo e o sétimo dia após a lesão. Com a extrusão inicial da bainha de mielina, em até três dias após a lesão do axônio, se inicia a divisão e a proliferação das células de Schwann. Essas células também realizam fagocitose e estão associadas à produção de substâncias quimiotáticas, elas se alinham ao longo da lâmina basal, formando as bandas de Büngner, e auxiliam na orientação do crescimento axonal (SIQUEIRA, 2007; SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013).

A regeneração axonal periférica depende de uma resposta inflamatória rápida e eficiente, visto que as células de Schwann e macrófagos comunicam-se por meio de redes de citocinas, controlando a fagocitose e fatores de crescimento. Em roedores, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, inicia de três a cinco horas após a lesão e o número de macrófagos, tanto endógenos quanto sistêmicos, atinge seu máximo de quatro a sete dias após a lesão. Ademais, neste tempo a barreira sanguínea do nervo torna-se mais permeável, facilitando a migração celular e a reparação nervosa (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007; SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013). Svennigsen e Dahlin (2013) argumentam que atrasos nesse processo podem levar à perda da capacidade regenerativa.

Para fins de comparação, não foram encontrados estudos similares do uso da sericina em LNP's, sendo estes os primeiros dados morfológicos e funcionais advindos da aplicação deste biomaterial, seja aplicado diretamente sobre a lesão ou no tratamento sistêmico. No entanto, a perspectiva sobre a aplicação deste biomaterial em outros tecidos se mostrou promissora (ARANWIT et al., 2009; DINESCU et al., 2013; ARANWIT et al., 2013; ERSEL et al., 2016; PADOL et al., 2012; WANG et al., 2015), levantando a expectativa de sua aplicação no reparo nervoso periférico.

Quanto aos resultados obtidos no índice funcional do isquiático, identificou-se diferença significativa somente entre CON e os demais grupos testados e, quando comparado a intergrupos, e individualmente, houve diferença somente da AV1, feita previamente a lesão. Apesar das diferenças de tempo na evolução funcional após a intervenção cirúrgica, foi observado que até o 14º dia (AV6), todos os grupos ainda apresentavam diferenças significativas em comparação ao CON, porém, a partir da

AV7 (21º dia), apesar de ainda apresentar recuperação motora incompleta, não foi observado diferença significativa na avaliação funcional, mesmo quando comparado ao CON.

Oliveira et al. (2008) relatam que a natação com sobrecarga na fase inicial da regeneração nervosa causou danos à recuperação funcional, e a associação com estimulação elétrica não teve efeito sobre o reparo nervoso, então propondo que os protocolos de intervenção evitem sobrecarga. Contudo, Lós et al. (2016) relatam que a intervenção precoce em meio aquático, após reparo cirúrgico de uma lesão nervosa periférica completa, não compromete o processo regenerativo das fibras nervosas mas estimula a neovascularização fisiológica.

De forma concordante, Teodori et al. (2011), citam que o exercício de natação, na fase aguda e tardia da lesão nervosa periférica do nervo isquiático, em ratos *Wistar*, por esmagamento, acelera a regeneração nervosa e melhora a transmissão sináptica, o que se confirma parcialmente neste estudo, já que no teste com o analgesímetro digital de “Von Frey”, realizado na região da incisão cirúrgica, todos os grupos demonstraram aumento do limiar nociceptivo, porém o LNAT demonstrou uma evolução significativamente mais rápida a partir da AV6 (14º dia).

Já os resultados vinculados à pressão plantar, buscando identificar a hipernocicepção, todos os grupos apresentaram boa evolução individual, tendo o LNAT e LSRNT desempenhos semelhantes, estabilizando mais rapidamente que o LES e LSER, sendo que quando comparados entre si, no momento da AV6 (14º dia), o grupo LNAT estava em melhores condições que o LES, LSER e LSRNT, podendo ser atribuído a um possível efeito aquático, concordando com estudos que sugerem a natação como fator que pode melhorar alodinia em modelos animais de dor neuropática, mas os mecanismos não são completamente compreendidos (KAMI; TAJIMAL; SENBA, 2016). É importante ressaltar que nas últimas avaliações (21º e 22º dias), tal diferença não foi mais observada (Tab. 03).

Sta et al. (2014), em estudo que investigou as características funcionais e morfológicas do nervo isquiático, quanto à sua degeneração e regeneração após lesão por esmagamento em ratos, citam que a recuperação da função sensorial ocorreu após o 17º dia, se mantendo relativamente baixa até o 24º dia, o que corrobora com os achados relacionados aos testes de função e alodinia, que não mostravam melhora significativa até o 14º dia, e nas avaliações do 21º e 22º dia

após a lesão, se mostraram significativamente com melhora quando comparadas ao CON.

Além disso, foi verificado que houve diferença do LNAT para o LSER constante durante as avaliações posteriores ao 14^o dia, o que acabou evidenciando um efeito pró inflamatório exacerbado vinculado a exposição nervosa direta à sericina, que poderia ter causado essa disparidade, o que sustenta estudos que citam exercícios de longa duração como estratégia eficaz para o controle do processo inflamatório e da dor, pois alteram os níveis de citocinas inflamatórias, neurotrofinas, neurotransmissores e opióides endógenos (KAMI; TAJIMAL; SENBA, 2016; KUPHAL; FIBUCH; TAYLOR, 2007).

No tocante ao comportamento observado no grupo LSER, no qual algumas evidências corroboram com reação inflamatória exacerbada, quando comparado aos demais grupos, alguns autores sugerem o uso de sericina associado ao aumento da resposta inflamatória, por causarem hipersensibilidade decorrentes de respostas imunitárias exacerbadas (BHATTACHARJEE et al., 2013; VEPARI; KAPLAN, 2006; TEUSCHL; GRIENSVEN; REDL, 2014). Ressalta-se entretanto, que o aumento da resposta inflamatória é quesito importante a ser considerado na regeneração nervosa (SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013; NAVARRO; VIVO; VALERO CABRE, 2007). Aramwit et al. (2009), destacam que a sericina não é tóxica e pode promover cicatrização de feridas cutâneas, sendo que os níveis de mediadores inflamatórios IL-1 β e TNF- α , observados sete dias após a lesão, são significativamente inferiores nas feridas sem tratamento com o biopolímero. Em estudo comparativo de alterações morfológicas nas fibras de seda, com e sem a presença de sericina, observou que nas fibras com sericina houve a ativação de células inflamatórias, como polimorfonucleadas, leucócitos, eosinófilos e macrófagos (LIU et al., 2007).

Com relação aos achados morfométricos, observou-se que a quantidade de FNV (maiores que 4 μ m de diâmetro), fibras que estimam-se ser mais antigas, LNAT teve desempenho superior ao LES, porém não foi diferente dos demais, predominando diferenças significativas do CON com todos os grupos.

Todavia, quando observadas as fibras nervosas viáveis menores de 4 μ m, o grupo LSRNT apresentou quantidades significativamente maiores que todos os demais grupos, inclusive ao CON, podendo ser explicado pelo estímulo a diferenciação mais rápida e regeneração do tecido nervoso, promovido pela sericina

e pelo exercício físico de natação combinados, o que também pode, ser visualizado quando observa-se os números de FNNV menores que 4 μm de diâmetro, em que o LSRNT obteve valores significativamente maiores que CON, LNAT e LES, podendo ser um efeito positivo. No entanto, devido ao pequeno tamanho dessas fibras e pelas características morfológicas, podem estar em degeneração ou em processo de remodelação, não estando aptas para a condutibilidade nervosa. Mas, não foi observada nenhuma FNNV menor de 4 μm no CON, e pouquíssimas FNV menores, sugerindo que, apesar de ainda não viáveis para a condutibilidade nervosa, a grande maioria das fibras menores observadas (Tab. 04), possivelmente são resultado do processo de regeneração apesar de não ser possível a identificação de forma.

Interessante comparar os eventos decorrentes do estudo de Sta et al., (2014) os quais observaram uma sequência de eventos na área distal a compressão nervosa, com um padrão de degeneração, seguido por brotação axonal, ampliação dos axônio e remielinização, sendo que o pico do processo fagocitário ocorreu ao 14º dia, tendo o número de novos axônios e seu diâmetro aumentado com o tempo, e a remielinização foi observada somente a partir do 21º dia, corroborando com os achados no presente estudo.

Já as fibras nervosas não viáveis maiores que 4 μm evidenciam que o LSR obteve desempenho pior que o LES, indicando juntamente com outras evidências, que a sericina utilizada isoladamente, tenha efeito pró-inflamatório exacerbado (. Ainda os dados de diâmetro de fibra nervosa, diâmetro de axônio e espessura da bainha de mielina, evidenciaram a eficácia do modelo de lesão, isso porque as fibras maiores demonstram diferenças significativas do CON em relação aos demais, embora não apresentaram diferenças relevantes a presença da sericina, associada ou não ao exercício resistido de natação.

Alguns estudos mostraram que a sericina foi responsável por indução de citocinas pró-inflamatórias e aumento da fagocitose, além de mostrar estimulação do fator de transcrição NF-Kb e p38 quinase, que estão amplamente envolvidos na regulação de vias pró-inflamatórias (BHATTACHARJEE et al., 2013). Compreende-se, então que o processo inflamatório é fundamental para regeneração nervosa (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007; SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013), além do exercício de natação acelerar a regeneração nervosa e melhorar a transmissão sináptica (TEODORI et al., 2011). Os dados compilados no presente estudo,

denotaram, pelas avaliações da função motora e principalmente os dados morfológicos observados, uma ação da sericina em ampliar o processo inflamatório quando observada isoladamente e, de alguma forma, houve regulação da ação pró-inflamatória da proteína sericina pela associação ao exercício de natação resistido, trazendo uma potencialização do processo de reparo nervoso.

Apesar dos resultados levarem a novas possibilidades de intervenção, fica evidente a necessidade de mais estudos investigativos dessa associação, tanto por períodos estendidos de tratamento, estudo molecular dos tecidos e por outras possíveis apresentações da proteína sericina, que podem gerar mais associações e, conseqüente, aprimoramento no tratamento de lesões nervosas periféricas.

CONCLUSÃO

A associação do tratamento de sericina e da natação evidenciou um efeito regulador da ação pró-inflamatória da sericina pelo exercício resistido de natação. Já a sericina isolada provocou potencialização do processo inflamatório e o tratamento com exercício de natação resistido, mostrou boa evolução quanto ao limiar nociceptivo e alodinia.

REFERÊNCIAS

ARAMWIT, P.; KANOKPANONT, S.; DE-EKNAMKUL W.; SRICHANA, T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 5, p. 556-561, 2009.

ARAMWIT, P.; PALAPINYO, S.; SRICHANA, T.; CHOTTANAPUND, S.; MUANGMAN, P. Silk sericina ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. **Archives of Dermatological Research**, v. 305, n. 1, p. 585-594, 2013.

BARAJAS-GAMBOA, J. A.; SERPA-GUERRA, A. M.; RESTREPO-OSORIO, A.; ÁLVAREZ-LÓPEZ, C. Sericin applications: a globular silk protein. **Ingeniería y Competitividad**, v. 18, n. 2 p. 193-206, 2016.

BHATTACHARJEE, M.; SCHULTZ-THATER, E.; TRELLA, E.; MIOT, S.; DAS, S.; LOPARIC, M.; RAY, A. R.; MARTIN, I. SPAGNOLI, G. C.; GHOSH, S. The role of 3D structure and protein conformation on the innate and adaptive immune responses to silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 34, n. 33, p. 8161-8171, 2013.

BRIDGE, P. M.; BALL, D. J.; MACKINNON, S. E.; NAKAO, Y.; BRANDT, K.; HUNTER, D. A.; HERTL, C. Nerve crush injuries - a model for axonotmesis. **Experimental Neurology**, v. 127, n. 2, p. 284-290, 1994.

BRULL, R.; HADZIC, A., REINA, M. A.; BARRINGTON, M. J. Pathophysiology and etiology of nerve injury following peripheral nerve blockade. **Regional anesthesia and Pain Medicine**, v. 40, n. 5, p. 479-490, 2015.

CAMPBELL, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clinical neurophysiology**, v. 119, n. 9, p. 1951-1965, 2008.

CHIMKIN, A. S. The effects of various swimming training protocols on cardiac capacity and ventricular fibrillation threshold in rats. **Central European Journal of Sport Sciences and Medicine**, v. 2, n. 2, p. 9-14, 2013.

DIAS, F. J.; ISSA, J. P. M.; COUTINHO-NETTO, J.; FAZAN, V. P. S.; SOUSA, L. G.; IYOMASA, M. M.; PAPA, P. C.; WATANABE, I. Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy protein (*Hevea brasiliensis*) administration following a crush injury of the sciatic nerve in rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 349, n. 2015, p. 129-137, 2015.

DINESCU, S.; GALATEANU, B.; ALBU, M.; LUNGU, A.; RADU, E.; HERMENEAN, A.; COSTACHE, M. Biocompatibility assessment of novel collagen-sericin scaffolds improved with hyaluronic acid and chondroitin sulfate for cartilage regeneration. **Hindawi Publishing Corporation – Biomed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 1-11, 2013.

DISHMAN, R. K.; BERTHOUD, H.; BOOTH, F. W.; COTMAN, C. W.; EDGERTON, V. R.; FLESHNER, M. R.; GANDEVIA, S. C.; GOMEZ-PINILLA, F.; GREENWOOD, B. N.; HILLMAN, C. H.; KRAMER, A. F.; LEVIN, B. E.; MORAN, T. H.; RUSSO-NEUSTADT, A. A.; SALAMONE, J. D.; HOOMISSEN, J. D. V.; WADE, C. E.; YORK, D. A.; ZIGMOND, M. J. Neurobiology of Exercise. **Obesity**, v. 14, n. 3, p. 345-356, 2006.

DUBOVÝ, P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. **Annals of Anatomy**, v. 193, n. 4, p. 267-275, 2011.

ERSEL, M.; UYANIKGIL, Y.; AKARCA, F. K.; OZCETE, E.; ALTUNCI, Y. A.; KARABEY, F.; CAVUSOGLU, T.; MERAL, A.; YIGITTURK, G.; CETIN, E. O. Effects of silk sericina on incision wound healing in a dorsal skin flap wound healing rat model. **Medical Science Monitor**, v. 22, n. 1, p. 1064-1078, 2016.

GIMENES, M. L.; SILVA, V. R.; VIEIRA, M. G. A.; SILVA, M. G. C.; SCHEER, A. P. High molecular sericina from *Bombyx mori* cocoons: extraction and recovering by ultrafiltration. **International journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 3, p. 226-271.

HASSIBA, A. J.; ZOWALATY, M. E.; NASRALLAH, G. K.; WEBSTER, T. J.; LUYT, A. S.; ABDULLAH, A.; ELZATAHRY, A. A. Review of recent research on biomedical applications of electrospun polymer nanofibers for improved wound healing. **Nanomedicine**, v. 11, n. 6, p. 715-737, 2016.

HUANG, W.; BEGUM, R.; BARBER, T.; IBBA, V.; TEE, N. C. H.; HUSSAIN, M.; ARASTOO, M.; YANG, Q.; ROBSON, L. G.; LESAGE, S.; GHEYSENS, T.; SKAER, N. J. V.; KNIGHT, D. P.; PRIESTLEY, J. V. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. **Biomaterials**, v. 33, n.1, p. 59-71, 2012.

JANG, S.; LEE, J. Effects of physical exercise on the functional recovery of rat hindlimbs with impairments of the sciatic nerve as assessed by 2D video analysis. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 27, n. 3, p. 935-938, 2015.

JUNQUEIRA, L.C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KAMI, K.; TAJIMA, F.; SENBA, E. Exercise-induced hypoalgesia: potential mechanisms in animal models of neuropathic pain. **Anatomical Science International**, v. 92, n. 1, p. 79-90, 2016.

KEAWLORN, W.; LIMPEANCHOB, N.; TIYABOONCHAI, W.; PONGCHAROEN, S.; SUTHEERAWATTANANONDA, M. The effect of dietary sericin on rats. **Science Asia**, v. 39, n. 1, p. 252-256, 2013.

KUMAR, A. A preliminary screening of silk protein (sericina) for the anti-Leishmanial properties and effect on immune response in visceral leishmaniosis. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, n.7, p. 1182-1187, 2015.

KUNZ, R. I.; BRANCALHÃO, R. M. C.; RIBEIRO, L. F. C.; NATALI, M. R. M. Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. **BioMed Research International**, v. 2016, n. 1, p. 1-19, 2016.

KUPHAL, K. E.; FIBUCH, E. E.; TAYLOR, B. K. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 12, p. 989-997, 2007.

LIMPEANCHOB, N.; TRISAT, K.; DUANGJAI, A.; TIYABOONCHAI, W. PONGCHAROEN, S.; SUTHEERAWATTANANONDA, M. Sericin reduces serum cholesterol in rats and cholesterol uptake into caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 12519-12522, 2010.

LIU, H.; GE, Z.; WANG, Y.; TOH, S. L.; SUTTHIKHUM, V.; GOH, J. C. H. Modification of sericina-free silk fibers for ligament tissue engineering application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 82, n. 1, p. 129-138, 2007.

LÓS, D. B.; SILVA, I. B.; LIRA, K. D. S.; ANDRADE, R. F.; MORAES, S. R. A. Efeito da natação na regeneração do nervo ciático após neurotome experimental. **Revista Fisioterapia & Saúde Funcional**, v. 5, n. 1, p. 23-29, 2016.

MANDELBAUM-LIVNAT, M. M.; ALMOG, M.; NISSAN, M.; LOEB, E.; SHAPIRA, Y.; ROCHKIND, S. Photobiomodulation Triple Treatment in Peripheral Nerve Injury: Nerve and Muscle Response. **Phoomedicine and Laser Surgery**, v. 34, n. 12, p. 638-645, 2016.

MAZZER, P. Y. C. N.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N.; FAZAN, V. P. S. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato, **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 6, p. 220-225, 2006.

MIRANDA, G. E.; TORRES, R. Y. Epidemiology of Traumatic Peripheral Nerve Injuries Evaluated with Electrodiagnostic Studies in a Tertiary Care Hospital Clinic. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 35, n. 2, p. 76-80, 2016.

MONDAL, M.; TRIVEDY, K.; NIRMAL-KUMAR, S. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn – a review. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 63-76, 2007.

MONTE-RASO, V. V.; FONSECA, M. C. R.; MAZZER, N.; BARBIERI, G.; ROSA, R. C.; ZAMARIOLI, A.; BARBIERI, C. H. Esteira com velocidade controlada para captação da marcha **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 49-53, 2010.

NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 82, n. 4, p. 163-201, 2007.

NIJ, J.; KOSEK, E.; OOSTERWIJCK, J. V.; MEEUS, M. Dysfunctional endogenous analgesia during exercise in patients with chronic pain: to exercise or not to exercise? **Pain Physician**, v. 2012, n. 15, p. 205-213, 2012.

OLIVEIRA, L. S.; SOBRAL, L. L.; TAKEDA, S. V. M.; BETINI, J.; GUIRRO, R. R. J.; SOMAZZ, M. C.; TEODORI, R. M. Estimulación eléctrica y natación en la fase aguda de la axonotmesis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperación funcional. **Revista de Neurología**, v. 47, n. 1, p. 11-15, 2008.

ONSA-ARD, A.; SHIMBHU, D.; TOHARUS, J.; SUTHEERAWATTANANONDA, M.; PANTAN, R.; TOCHARUS, C. Hypotensive and vasorelaxant effects of sericin-derived oligopeptides in rats. **Pharmacology**, v. 2013, n. 1, p. 1-8, 2013.

PADOL, A. R.; JAYAKUMAR, K.; MOHAN, K.; MANOCHAYA, S. Natural biomaterial silk proteins: Applications in tissue repair. **International Journal of Materials and Biomaterials Applications**, v. 2, n. 4, p. 19-24, 2012.

PERETTI, A. L.; ROSA, C. T.; ERRERO, T. K., BARETTA, V.; SCHINEIDER, S. C. S.; BERTOLINI, G. R. F. Avaliação comportamental de ratos treinados em natação forçada. **Scientia Medica**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2015.

POSSAMAI, F.; SIEPKO, C. M.; ANDRÉ, E. S. Investigação dos efeitos do exercício terapêutico sobre a regeneração nervosa periférica. **Acta Fisiátrica**, v. 17, n. 4, p. 142-147, 2010.

RITTER, L. L. N.; SANTOS, W. L. M.; RODRIGUES, J. G.; ALMEIDA, T. R.; NETO, O. B. Treinamento Físico por natação melhora perfil hepático em ratos Wistar tratados com dieta hiperlipídica. **Coleção Pesquisa em Educação Física**, v. 11, n. 2, p. 183-190, 2012.

SAADAT, S.; ESLAMI, V.; RAHIMI-MOVAGHAR V. The incidence of peripheral nerve injury in trauma patients in Iran. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery**, v. 17, n. 6, p. 539-544, 2011.

SARIKCIOGLU, L.; OGUZ N. Exercise training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. **International Journal of Neuroscience**, v. 109, n. 1, p. 173-171, 2001.

SAVASTANO, L. E.; LAURITO, S. R.; FITT, M. R.; RASMUSSEN, J. A.; POLO, V. G.; PATTERSON, S. I. Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 30, n. 227, p. 166-180, 2014.

SILVA, D. M. R.; GOMES-FILHO, A.; OLIVON, V. C.; SANTOS, T. M. S.; BECHER, L. K.; SANTOS, R. A. S.; LEMOS, V. S. Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. **Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 1, p. 1272-1277, 2011.

SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Revista Neurociências**, v. 15, n. 3, p. 226-233, 2007.

SOUZA, M. F.; KRAYCHETE, D. C. A ação analgésica da lidocaína intravenosa no tratamento da dor crônica: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, n. 5, p. 386-392, 2014.

STA, M.; CAPPAERT, N. L. M.; RAMEKERS, D.; BAAS, F.; WADMAN, W. J. The functional and morphological characteristics of sciatic nerve degeneration and regeneration after crush injury in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 2014, n. 222, p. 189-198, 2014.

SVENNIGSEN, A. F.; DAHLIN, L. B. Repair of the peripheral nerve – remyelination that Works. **Brain sciences**, v. 3, n. 3, p. 1182-1197, 2013.

TEODORI, R. M.; BETINI, J.; OLIVEIRA, L. S.; SOBRAL, L. L.; TAKEDA, S. Y. M.; MONTEBELO, M. I. L. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. **Neural Plasticity**, v. 2011, n. 1, p. 1-8, 2011.

TEUSCHL, A.; GRIENSVEN, M. V.; REDL, H. Sericin removal from raw *Bombyx mori* silk scaffolds of high hierarchical order. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 20, n. 5, p. 431-439, 2014.

VALAT, J.; GENAVAY, S.; MARTY, M.; ROZENBERG, S.; KOES, B. Sciatica. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 24, n. 2, p. 241-252, 2010.

VEPARI, C.; KAPLAN D. L. Silk as a biomaterial. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 991-1007, 2007.

VIVANCOS, G. G.; VERRI JR, W. A.; CUNHA, T. M.; SCHIVO, I. R. S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Na electronic pressure-meter nociception paw tes for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 1, p. 391-399, 2004

WANG, Z.; WANG, J.; YANG, J; LUO, Z.; YANG, W.; XIE, H.; HUANG, K.; WANG, L. A neuroprotective sericina hydrogel as effective neuronal cell carrier for the repair of ischemic stroke. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 44, p. 1-34, 2015.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A - Parecer do CEUA da Unioeste



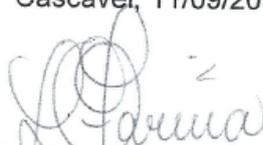
PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado “Características nociceptivas e histomorfométricas da lesão nervosa isquiática em ratos wistar tratados com proteína sericina e protocolo de exercício por natação”, sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 11/09/2015



Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE

7.2 Anexo B

7.2.1 Normas de publicação da Revista Brasileira de Reumatologia (Artigo 01)

Escopo e política

A **Revista Brasileira de Reumatologia (RBR)** publica artigos sobre temas reumatológicos e correlatos, após análise por seu Conselho Editorial. A RBR é catalogada no Web of Science, PUBMED/MEDLINE, Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), Scopus, Index Copernicus e Scielo (Scientific Electronic Library Online).

Ao submeter o manuscrito, os autores assumem a responsabilidade de o trabalho não ter sido previamente publicado nem estar sendo analisado por outra revista. Os manuscritos devem ser inéditos, ter sido objeto de análise e com anuência de todos os autores.

Artigos aceitos para publicação passam a ser propriedade da revista, não podendo ser reproduzidos sem consentimento por escrito.

A abreviatura de seu título é **Rev Bras Reumatol**, que deve ser usada em bibliografias, notas de rodapé e em referências bibliográficas.

Não há taxas para submissão e avaliação de artigos.

A Revista adota o sistema iThenticate para todos os manuscritos submetidos; na identificação de alto índice de pareamento os arquivos são submetidos a avaliação pelos editores.

Os manuscritos serão avaliados inicialmente por editor-chefe e/ou editor associado, e se considerado em conformidade com formato e escopo da Revista, seguirão para avaliação por no mínimo dois revisores com conhecimento científico na área de pesquisa, de procedência nacional ou estrangeira. Após as devidas correções e possíveis sugestões, o manuscrito receberá os pareceres favoráveis ou desfavoráveis dos revisores, que subsidiarão a subsequente reavaliação e recomendação de aceite ou rejeição pelo editor associado. As decisões finais serão de responsabilidade do editor-chefe".

Forma e preparação de manuscritos

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

O manuscrito pode ser submetido em português ou inglês, em espaço duplo, com margens de 2,5 cm. No texto não devem ser empregadas abreviaturas não convencionais, gírias (jargões) médicas ou redação tipo telegráfica. A citação de medicamentos e produtos farmacêuticos deve ser feita utilizando-se apenas a nomenclatura farmacológica, sem menção do nome comercial.

ESTRUTURA DO MANUSCRITO

*Manuscript**, *Title Page**, *Cover Letter* e *Author Agreement** devem ser enviados em arquivos individuais. Tabelas e figuras devem ser numeradas conforme citadas no texto e enviadas em arquivos separados, com títulos e legendas correspondentes. (*arquivos obrigatórios)

Página do título

Deve conter: a) título do artigo; b) nome completo dos autores e sua titulação mais importante; c) departamento(s) e instituição(ões) onde se originou o trabalho; d) nome, endereço completo e e-mail válido do autor responsável para correspondência; e) conflito de interesse e agências financiadoras relevantes; f) título resumido com no máximo 60 caracteres.

Author Agreement

É o documento no qual os autores declaram a originalidade do manuscrito, além de aprovarem o artigo objeto da submissão, a autoria e a ordem da lista de autores. Deve ser assinado por todos os autores. A seguir é apresentado um modelo.

Caro Editor,

Os autores, abaixo assinados, declaram que este manuscrito é original, não foi publicado antes e não se encontra submetido para qualquer outra publicação.

Gostaríamos de pedir a atenção do Editor para a presente publicação de nós autores, referente a aspectos do presente manuscrito submetido. Confirmamos que o manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores signatários e que não há nenhum outro autor a fazer parte senão os listados. Confirmamos também que a ordem dos autores listada no manuscrito foi aprovada por todos.

Entendemos que o Autor para Correspondência será o único contato para o processo editorial. Ele será o único responsável pela comunicação com os demais autores acerca do progresso da submissão, da revisão do manuscrito e de sua aprovação final.

(Assinatura de todos os autores)

Artigo Original

Deve conter: página do título, página de resumo com palavras-chave, introdução, material e métodos ou pacientes e métodos, resultados e discussão, agradecimentos, referências, tabelas, figuras e legendas das figuras. Não deve exceder 5.000 palavras, incluindo-se as referências e excluindo-se a página do título, resumo, tabelas e legendas. Pode exibir até seis figuras ou tabelas e até 50 referências.

Página de resumo

Deve conter: a) objetivo, métodos, resultados e conclusões, não excedendo 250 palavras; b) três a cinco palavras-chave.

Introdução

A finalidade dessa seção é definir o propósito e as razões para a realização do trabalho.

Não se recomenda extensa revisão da literatura.

Pacientes e métodos ou Material e métodos

Deve incluir informações suficientes que permitam a reprodução do trabalho e, quando pertinente, a aprovação pelo Comitê de Ética institucional. Os métodos empregados na análise estatística devem sempre ser citados.

Resultados

Devem ser claros e concisos. Tabelas e gráficos não devem duplicar informações.

Discussão

Deve ser concisa, interpretando os resultados no contexto da literatura atual. É conveniente não ultrapassar a metade do número de páginas do trabalho completo.

Agradecimentos

Apenas às pessoas que contribuíram, por exemplo, com técnicas, discussão e envio de pacientes. Auxílio financeiro deve ser referido na página do título.

Referências

Devem ser citadas no texto em algarismos arábicos, sobrescritos e depois da pontuação, sem parênteses ou colchetes. A numeração deve ser sequencial, de acordo com a ordem de citação no texto. Nas referências com mais de seis autores, devem ser citados os seis primeiros, seguidos pela expressão *et al.* Sugere-se a utilização dos programas Reference Manager ou Endnote, seguindo-se o estilo Vancouver. Exemplos de referência para diferentes formatos são apresentados a seguir. Os autores devem consultar o NLM's Citing Medicine para mais informações sobre os formatos das referências.

Artigo de revista

1. Rivero MG, Salvatore AJ, Gomez-Puerta JA, Mascaro JM, Jr., Canete JD, Munoz-Gomez J *et al.* Accelerated nodulosis during methotrexate therapy in a patient with systemic lupus erythematosus and Jaccoud's arthropathy. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(12):1587-8.

Artigo extraído de endereço eletrônico

2. Cardozo JB, Andrade DMS, Santiago MB. The use of bisphosphonate in the treatment of avascular necrosis: a systematic review. *Clin Rheumatol* 2008. Available from: <http://www.springerlink.com.w10069.dotlib.com.br/content/105j4j3332041225/fulltext.pdf>. [Accessed in February 24, 2008].

Livro

3. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

Tabelas e Figuras

Cada tabela ou figura deverá ser numerada em algarismo arábico e enviada em arquivo separado (.jpg, .tif, .png, .xls, .doc) com 300 dpi no mínimo. Título e legenda devem estar no mesmo arquivo da figura ou tabela a que se referem. Tabelas e ilustrações devem ser autoexplicativas, com informações suficientes para sua compreensão sem que se tenha de recorrer ao trabalho. Fotomicrografias devem incluir a escala apropriada.

Artigo de Revisão

Revisões, preferencialmente sistemáticas, podem ser submetidas à RBR, devendo abordar com profundidade um tema de interesse para o reumatologista. Não apresentam estruturação padronizada, prescindindo de introdução ou discussão. Devem apresentar resumo sem subdivisões, com três a cinco palavras-chave, e não devem exceder 6.000 palavras, incluindo-se as referências e excluindo-se a página do título, resumo, tabelas e legendas. Podem exibir até cinco figuras ou tabelas e até 70 referências.

Relato de Caso

Deve incluir resumo e palavras-chave, sem necessidade de subdivisões. O texto, porém, apresenta as seguintes seções: introdução, que deve ser concisa; relato de caso, contendo a descrição e a evolução do quadro clínico, exames laboratoriais, ilustrações e tabelas (que substituem as seções material e métodos e resultados); e discussão. Deve conter no máximo seis autores, e não deve exceder 1.500 palavras, incluindo-se as referências e excluindo-se a página do título, resumo, tabelas e legendas. Pode exibir até duas figuras ou tabelas e até 15 referências.

Comunicação breve

Aborda um ponto ou detalhe específico de um tema. Deve incluir resumo com no máximo 250 palavras, e três a cinco palavras-chave. O texto não necessita subdivisões, deve ter até 2.500 palavras incluindo-se as referências e excluindo-se a página do título, resumo, tabelas e legendas. Pode exibir até três figuras ou tabelas e até 25 referências.

Regras para aplicar tempos verbais apropriados de acordo com o contexto ou seção

Contexto ou seção	Tempo verbal apropriado
Resumo	Passado
Introdução	Presente, quando se referir a fatos estabelecidos e conhecimento prévio
Métodos, materiais e resultados	Passado
Discussão/Conclusão	Combinado de passado (quando se referir a resultados obtidos no trabalho) e presente (quando se referir a fatos estabelecidos e conhecimento prévio); às vezes pode ser utilizado o futuro (especialmente quando se referir a perspectivas de trabalhos a serem realizados)
Atribuições	Passado Ex.: Andrade et al. relataram...

Descrição de Tabelas e Figuras	Presente
Conhecimento estabelecido e resultados prévios	Presente

Regras gerais para se obter uma boa escrita em um artigo científico:

1. Prefira a voz ativa
2. As sentenças devem ser curtas, claras e objetivas
3. A unidade de medida deve ser abreviada quando empregada com valores numéricos (p. ex., 1 mg), mas escrita por extenso quando separada de valor numérico. Utilize o Sistema Internacional de Unidades (*SI units*) para definir as unidades de medida. Lembre-se de deixar um espaço entre o número e a unidade (p. ex., 10 mg/dL), exceto quando for porcentagem, que deve estar junto (p. ex., 70%). O plural das unidades de medida é a mesma forma do singular (p. ex., 1 mL, 10 mL; 1 h, 10 h). Quando iniciarem a frase, os números devem estar por extenso, e não em algarismo arábico
4. Defina a abreviação na primeira vez que aparecer no texto principal. Após a definição, use sempre a abreviação em vez da forma por extenso. Evite o uso de abreviações no título e no resumo
5. Ao escrever em inglês, não utilize contrações (p. ex., prefira *does not* em vez de *doesn't*)

Livro recomendado: Rogers SM. *Mastering scientific and medical writing: a self-help guide*. Berlin: Springer; 2007.

Considerações éticas e legais

A RBR segue as normas do *Uniform Requirements for Manuscripts (URM) Submitted to Biomedical Journals* desenvolvidas pelo *The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)* - fevereiro de 2006.

Conflito de interesse

A confiança pública no processo de revisão por pares e a credibilidade dos artigos publicados dependem, em parte, de como o conflito de interesse é administrado durante a redação, a revisão por pares e a decisão editorial. O conflito de interesse existe quando um autor (ou instituição do autor), revisor ou editor tem relações financeiras ou pessoais que influenciem de forma inadequada (viés) suas ações (tais relações são também conhecidas como duplo compromisso, interesses conflitantes ou fidelidades conflitantes). Essas relações variam entre aquelas com potencial insignificante até as com grande potencial para influenciar o julgamento, e nem todas as relações representam verdadeiro conflito de interesse. O potencial conflito de interesse pode existir dependendo se o indivíduo acredita ou não que a relação afete seu julgamento científico. Relações financeiras (tais como emprego, consultorias, posse de ações, testemunho de especialista pago) são os conflitos de interesse mais facilmente identificáveis e os mais suscetíveis de minar a credibilidade da revista, dos autores e da própria ciência. No entanto, podem ocorrer conflitos por outras razões, tais como relações pessoais, competição acadêmica e paixão intelectual.

Consentimento informado

Os pacientes têm o direito à privacidade, que não deve ser infringida sem o consentimento informado. A identificação de informações, incluindo os nomes dos pacientes, iniciais ou números no hospital, não devem ser publicadas em descrições,

fotografias e genealogias, a menos que a informação seja essencial para os propósitos científicos e o paciente (ou responsável) dê o consentimento livre e esclarecido para a publicação. O consentimento informado para este propósito requer que o manuscrito a ser publicado seja mostrado ao paciente. Os autores devem identificar os indivíduos que prestam assistência a escrever e divulgar a fonte de financiamento para essa assistência. Detalhes identificadores devem ser omitidos se não são essenciais. O anonimato completo é difícil de se conseguir; no entanto, no caso de qualquer dúvida, o consentimento deve ser obtido. Por exemplo, mascarar a região ocular em fotografias de pacientes é uma proteção de anonimato inadequada. Se as características de identificação são alteradas para proteger o anonimato, como na linhagem genética, os autores devem garantir que as alterações não distorçam o significado científico. Quando o consentimento informado foi obtido, ele deve ser indicado no artigo publicado.

Princípios éticos

Ao relatar experimentos em seres humanos, os autores devem indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentação humana (institucional e nacional) e com a Declaração de Helsinque de 1975, revisado em 2000. Se houver dúvida se a pesquisa foi realizada em conformidade com a Declaração de Helsinque, os autores devem explicar a razão para sua abordagem e demonstrar que o corpo de revisão institucional aprovou explicitamente os aspectos duvidosos do estudo. Ao relatar experimentos com animais, os autores devem indicar se as orientações institucionais e nacionais para o cuidado e a utilização de animais de laboratório foram seguidas.

Registro de ensaios clínicos

Os ensaios clínicos devem ser registrados segundo recomendação da OMS em www.who.int/ictcp/en/. A definição de ensaios clínicos incluem ensaios preliminares (fase I): um estudo prospectivo com o recrutamento de indivíduos submetidos a qualquer intervenção relacionada à saúde (medicamentos, procedimentos cirúrgicos, aparelhos, terapias comportamentais, regime alimentar, mudanças nos cuidados de saúde) para avaliar os efeitos em desfechos clínicos (qualquer parâmetro biomédico e de saúde, inclusive medidas farmacocinéticas e reações adversas). A RBR tem o direito de não publicar trabalhos que não cumpram estas e outras normas legais e éticas explicitadas nas diretrizes internacionais.

Financiamento e apoio

Os autores devem, também, informar se receberam financiamento ou apoio de instituições como CNPq, CAPES, Fundos Remanescentes da SBR, instituições universitárias, laboratórios etc.

Secretaria Editorial RBR

Revista Brasileira de Reumatologia
Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 2.466 - conj. 93-94
CEP: 01402-000 - São Paulo - SP - Brasil
Tel./fax: (11) 3289-7165
e-mail: rbreumatol@terra.com.br