

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

ANDRÉ JUNIOR SANTANA

**ASSOCIAÇÃO DA PROTEÍNA SERICINA AO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO NA
REGENERAÇÃO DO MÚSCULO PLANTAR APÓS LESÃO COMPRESSIVA DO
NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS *WISTAR***

CASCADEL- PR

Agosto/2017

ANDRÉ JUNIOR SANTANA

**ASSOCIAÇÃO DA PROTEÍNA SERICINA AO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO NA
REGENERAÇÃO DO MÚSCULO PLANTAR APÓS LESÃO COMPRESSIVA DO
NERVO ISQUIÁTICO DE 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

COORIENTADORA: Profa. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão.

COORIENTADORA: Profa. Dra. Márcia Miranda Torrejais

CASCADEL- PR

Agosto/2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

André Junior Santana

Associação da proteína sericina ao exercício de natação na regeneração do músculo plantar, após lesão compressiva do nervo isquiático de 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

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE (Orientador)

Profa. Dra. Márcia Miranda Torrejais

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

Profa. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

Prof. Dr. Everton Paulo Roman

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

CASCAVEL- PR

Agosto/2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida e por tornar tudo possível.

À minha mãe Iraci, minha guerreira de um coração e amor incondicionais, minha base forte;

Aos meus irmãos, Alexandre e Adílio, por serem, além de irmãos, amigos e companheiros. Vocês são meu alicerce. Sem vocês nada disso seria possível.

À minha namorada Isabella, por estar sempre ao meu lado, pelo carinho, pela paciência e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao Professor Dr. Gladson, pelo altruísmo, incentivo, confiança, sabedoria e humildade na partilha do conhecimento e experiência, por ser um grande pesquisador e excelente pessoa.

À Professora Dra. Rose Meire Costa Brancalhão, pelos conhecimentos transmitidos, pela serenidade, maturidade, sabedoria e pelo auxílio em todas as etapas da realização deste estudo.

À Professora Dra. Márcia, pelo norte, incentivo, cobrança e competência, por ser uma excelente pesquisadora e mulher de fibra.

À Professora Dra. Lucinéia, pela dedicação incansável, incentivo e acima de tudo, por ser uma grande pesquisadora, que compartilha com humildade e competência seus conhecimentos e experiências.

Ao colega de mestrado Jean, pelo apoio e principalmente pela amizade que construímos durante esse período tão importante de nossas vidas.

Aos professores Dr. Lucinar Flores e Dr. Everton Roman, membros da banca, pela disponibilidade e ensinamentos.

E a todas as pessoas que colaboraram de forma direta ou indireta, para a conclusão desta etapa; em especial, à Dra. Rêgina Kunz, pelo auxílio no desenvolvimento e andamento do trabalho.

“Não somos o que sabemos.
Somos o que estamos dispostos
a aprender”.

“Paulo Campos”.

RESUMO GERAL

Lesões nervosas periféricas causam uma série de alterações morfológicas, resultando em complicações funcionais, nervosas e musculares. Várias são as medidas terapêuticas aplicadas na reabilitação, como, por exemplo, o exercício físico em meio aquático, que vem sendo amplamente estudado no que diz respeito à melhora funcional, embora seu potencial regenerativo necessite de maiores comprovações. Ainda, é importante a busca de substâncias com potencial terapêutico e que possam ser utilizadas em associação ao exercício físico, de forma a intensificar a recuperação. O biopolímero protéico sericina, obtido do casulo do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), apresenta uma série de efeitos farmacológicos regenerativos importantes, com ação cicatrizante no tratamento de queimaduras, melhora no desempenho aeróbico e na oxidação de gordura em repouso. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da sericina associada ou não ao exercício físico de natação sobre a recuperação muscular de ratos *Wistar*, submetidos à lesão nervosa isquiática. O experimento foi desenvolvido numa amostra composta por 40 animais, com 10 ± 2 semanas de idade, separados aleatoriamente em cinco grupos: Ct: controle; Ls: lesão; Ser: lesão + sericina; Nat: lesão + natação; Ser+Nat: lesão + sericina + exercício físico. Os animais foram anestesiados e submetidos à lesão por compressão do nervo isquiático direito. Imediatamente após a compressão nervosa, nos animais dos grupos Ser e Ser+Nat, foram aplicadas uma dose de 100 μ L de sericina hidrolisada sobre o nervo lesionado. Já os animais dos grupos Nat e Ser+Nat, 72 horas após a lesão, foram tratados com exercício físico resistido de natação, com sobrecarga de 10% da massa corporal, durante três semanas, cinco dias por semana. Os animais realizaram quinze minutos de natação na primeira semana, 20 minutos na segunda e 25 minutos na terceira semana. No decorrer do tratamento, avaliou-se a força de preensão do membro pélvico direito de todos os animais. Ao término do período experimental, os animais foram anestesiados para dissecação e coleta do músculo plantar, sendo que a parte proximal foi processada e analisada histomorfologicamente, e a distal para análise histoenzimológica. Com relação aos dados funcionais de força muscular de preensão, morfologia e morfometria das junções neuromusculares, não foi observado influência significativa sobre o processo de regeneração neuromuscular. O mesmo ocorreu com as propriedades músculo esqueléticas, que não sofreram alterações significativas na associação da sericina e da natação. Embora o exercício físico de natação sozinho tenha sido eficiente na manutenção do conjuntivo intramuscular, a associação com sericina não foi capaz de alterar o fenótipo do músculo plantar, embora a axonotmese experimental o tenha feito.

PALAVRAS CHAVE: Nervos periféricos, fibra muscular, exercício físico, lesão nervosa, proteína da seda.

Association of sericin protein to swimming exercise in plantar muscle regeneration after sciatic nerve compression of Wistar rats

GENERAL ABSTRACT

Peripheral nerve damage causes a number of morphological changes, resulting in functional, nerve and muscle complications. There are several therapeutic measures applied in rehabilitation, such as physical exercise in the aquatic environment, which has been extensively studied in terms of functional improvement, although its regenerative potential needs more evidence. Also, it is important to search for substances with therapeutic potential and that can be used in association with physical exercise, in order to intensify recovery. The protein biopolymer, sericin, obtained from the cocoon of the silkworm (*Bombyx mori*), presents a series of important regenerative pharmacological effects, with cicatrizing action in the treatment of burns, improvement in the aerobic performance and the oxidation of fat at rest. In this sense, the objective of this study was to analyze the effect of sericin associated or not to physical swimming exercise on the muscular recovery of Wistar rats, submitted to sciatic nerve injury. The experiment was carried out in a sample composed of 40 animals, 10 ± 2 weeks old, randomly divided into five groups: Ct: control; Ls: injury; Being: injury + sericin; Nat: injury + swimming; Ser + Nat: injury + sericina + physical exercise. The animals were anesthetized and submitted to compression injury of the right sciatic nerve. Immediately after the nerve compression, a dose of 100 µL of hydrolyzed sericin was applied to the injured nerve in Ser and Ser + Nat animals. On the other hand, the animals of the Nat and Ser + Nat groups, 72 hours after the injury, were treated with resisted physical exercise of swimming, with overload of 10% of body weight, during three weeks, five days a week. The animals performed fifteen minutes of swimming in the first week, 20 minutes in the second and 25 minutes in the third week. During the treatment, the grip strength of the right pelvic limb of all animals was evaluated. At the end of the experimental period, the animals were anesthetized for dissection and collection of the plantar muscle, and the proximal part was processed and analyzed histomorphologically, and the distal for histoenzymological analysis. Regarding the functional data of muscular strength of grip, morphology and morphometry of the

neuromuscular junctions, no significant influence on the neuromuscular regeneration process was observed. The same occurred with the musculoskeletal properties, which did not suffer significant changes in the association of sericin and swimming. Although physical swimming exercise alone was efficient in maintaining the intramuscular conjunctiva, the association with sericin was not able to alter the plantar muscle phenotype, although experimental axonotmosis did so.

KEYWORDS: Peripheral nerves, muscle fiber, physical exercise, nerve damage, silk protein.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivo específico.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Estrutura do nervo periférico e Lesão nervosa.....	17
3.2 Músculo esquelético estriado.....	26
3.3 Junção Neuromuscular.....	29
3.4 Junção Neuromuscular e Lesão nervosa.....	31
3.5 Lesão nervosa e seus efeitos sobre o músculo.....	33
3.6 Exercício físico e processo de regeneração neuromuscular.....	37
3.7 Sericicultura	39
3.7.1 Estrutura do casulo da seda.....	40
3.7.2 Sericina, estrutura e métodos de extração.....	41
3.7.3 Sericina e seu potencial uso.....	43
4 REFERÊNCIAS.....	45
5 ARTIGOS CIENTÍFICOS	62
ANEXO A.....	101
ANEXO B.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fases de formação da fibra nervosa.....	14
Figura 2 -	Fibra nervosa amielínica.....	15
Figura 3 -	Estrutura da fibra nervosa periférica (Epineuro, perineuro e endoneuro)	16
Figura 4 -	Ilustração das musculaturas do membro inferior direito e do Nervo Esquiático.....	17
Figura 5 -	Nervo isquiático do rato.....	17
Figura 6 -	Ilustração dos Graus de lesões nervosas (Normal, Neuropraxia, Axonotmesis e Neurotmesis)	18
Figura 7 -	Representação esquemática dos cinco graus de lesão do nervo de acordo com Sunderland.....	19
Figura 8 -	Diagrama ilustrando a estrutura protéica do músculo esquelético estriado	23
Figura 9 -	Músculos da perna Vista posterior (ênfase no plantar)	26
Figura 10 -	Junções neuromusculares (normal-lesão)	30
Figura 11 -	Imagem da secção transversal de um casulo da seda.....	39

LISTAS DE ABREVIATURAS

Akt	Proteína Kinase B
ATP	Trifosfato de adenosina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Banda A	Anisotrópica
Banda I	Isotrópica
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
NGF	Fator de crescimento neural
INSS	Instituto Nacional do Seguro Social
JNM	Junção Neuromuscular
L4	Quarta vértebra lombar
L6	Sexta vértebra lombar
LNP	Lesão nervosa periférica
mg/Kg	Miligramas por quilo
MRF	Fator de regulação miogênica
MRF4	Fator de regulação miogênica 4
MyoD	Fator de regulação miogênica
Myf5	Fator miogênico 5
m-TOR	Mecanismo de Rapamicina em mamíferos
MuRF-1	Muscle RINGER-finger protein-1 ou atrogina
MAFbx	Muscle atrophy F-box
NCAM	Molécula de adesão neuronal
S3	Terceira vértebra sacral
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SUS	Sistema Único de Saúde

1 INTRODUÇÃO GERAL

A lesão nervosa periférica (LNP, doravante) pode resultar em implicações sensoriais, autonômicas e motoras, incluindo retração tecidual, dor e edema, além de diversas complicações secundárias, que comumente acometem o nervo isquiático (LAWRENCE; ROBINSON, 2000; SILVA; CAMARGO, 2010).

Em países desenvolvidos, a ocorrência anual de lesões é estimada entre 13 a 23 casos a cada 100.000 habitantes, incidindo principalmente na população economicamente ativa, como jovens entre 21 e 30 anos (SAADAT; ESLAMI; RAHIMI-MOVAGHAR, 2011; LI et al., 2014).

Um dos fatores causadores da LNP são as hérnias de disco, em um ou mais pontos da coluna vertebral, resultando em quadro de lombociatalgia (STAFFORD; PENG; HILL, 2007), o qual é um exemplo de doença crônica não transmissível (DCNT) (MOURA; CARVALHO; SILVA, 2007). Essas lesões implicam em alterações na função motora voluntária, levando ao aumento da morbidade, a incapacidades nas atividades de vida diária e laborais do indivíduo em decorrência do déficit sensorial, a dor crônica e atrofia, com conseqüente aumento dos custos do Sistema Único de Saúde Pública (SUS) (SIQUEIRA, 2007; SOUZA; KRAYCHETE, 2014).

Não obstante, o uso de estratégias terapêuticas que visem ao tratamento da LNP ainda se mostra muito discutida na literatura, devido às divergências encontradas entre os estudos voltados para o exercício físico de natação, referente à intensidade, à duração e ao período de aplicação, como alternativa na intervenção clínica (TEODORI et al., 2011; GAFFURI et al., 2011; BERTOLINI et al., 2011).

Estudos demonstram que o exercício físico de natação promove alterações morfológicas no músculo esquelético estriado (CIABATTARI; DAL PAI; DAL PAI, 2005). Quando associado à laser terapia, favorece o processo de reparo nervoso periférico, melhorando a funcionalidade, após LNP (ROSA JUNIOR et al., 2016). Além disso, há uma melhora no aporte e na utilização de glicose pelo músculo desnervado, bem como sua resposta à insulina (NUNES; MELLO, 2009). No entanto, o exercício físico já se mostrou ineficaz na redução do quadro algico, bem como no aumento da hiperalgesia (GAFFURI et al., 2011; BERTOLINI et al., 2011).

No tocante às alternativas terapêuticas, o uso de materiais biocompatíveis na regeneração nervosa periférica e muscular se faz pertinente (YANG, et al., 2007; YANG et al., 2011; SCHEAFER e UBINGER, 2013; SONG et al., 2013; DIAS et al., 2015). Entre esses materiais estão as proteínas fibroína e sericina, extraídas do casulo do bicho da seda, as quais têm sido objeto de pesquisas em vários campos das ciências da saúde (SAROVART et al., 2003; KONGDEE et al., 2004; LIMPEANCHOB et al., 2010; ZHIHONG et al., 2012; DINESCU et al., 2013; KIM et al., 2013; KIM et al., 2014).

Estudos voltados para o uso da sericina elencam inúmeros efeitos, incluindo a sua eventual proteção contra câncer de pele por supressão de respostas inflamatórias, estresse oxidativo e redução do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (ZHORIGETU et al., 2003). Pesquisas trazem que peptídeos da proteína sericina, associados ao exercício físico, melhoram o desempenho aeróbico, a oxidação de gordura e o aumento de testosterona (SUNHEE et al., 2010; KIM et al., 2013; KIM et al., 2014). Para além desses resultados, há registros do potencial efeito de cicatrização da córnea de ratos diabéticos (NAGAI et al., 2009), também se mostra biocompatível tanto no tratamento de queimaduras quanto na cicatrização de feridas (ARAMWIT et al., 2013).

No entanto, quanto ao seu potencial efeito no tratamento das LNPs, essa proteína ainda se mostra pouco estudada, mesmo que suas características biocompatíveis a tornem potencialmente promissora, indo de encontro com a atual literatura sobre o uso dessa proteína como alternativa biocompatível no tratamento de inúmeras disfunções orgânicas (ZHIHONG et al., 2012; SONG et al., 2013; ARAMWIT et al., 2013; WANG et al., 2015).

Segundo Wang et al. (2015), a sericina na forma de hidrogel reticulado, sericina-genipina (GSH), se mostrou neurotrópica e neuroprotetora, promovendo a extensão e a ramificação do axônio, bem como preveniu a morte celular de neurônios primários por hipóxia em cultura de células junto à genipina, um agente reticulador biocompatível que serve como potencial veículo de entrega, em um modelo de acidente vascular cerebral.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de pesquisas e de estudos que tematizem o uso de estratégias terapêuticas no tratamento das LNPs, a fim de questionar e de preencher as lacunas existentes na literatura quanto às divergências

dos achados a respeito do exercício físico de natação, assim como sua associação com materiais biocompatíveis, tornando possível uma melhor compreensão dos fatores que permeiam o processo de regeneração neuromuscular e a produção de conhecimento estratégico para intervenção clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar os efeitos do uso da proteína sericina associado ao exercício físico de natação no músculo plantar, após lesão compressiva do nervo isquiático de ratos *Wistar*.

2.2 Específicos

- Mensurar a força de preensão perante ou não a lesão nervosa.;
- Avaliar as possíveis alterações das junções neuromusculares (JNMs) do músculo plantar;
- Mensurar e caracterizar as possíveis alterações histomorfológicas do músculo plantar, advindas da regeneração nervosa, tratados com sericina e exercício de natação.

3 REVISÃO GERAL DE LITERATURA

Introdução

A revisão de literatura abrange diversos temas, que serão apresentados em capítulos, a fim de proporcionar ao leitor um embasamento introdutório dos assuntos que gradativamente serão abordados no decorrer da leitura. Tais assuntos permeiam as várias áreas do conhecimento; porém, no caso deste trabalho, foram: Sistema nervoso periférico, músculo esquelético estriado, lesão nervosa e medidas terapêuticas: Exercício físico e proteína da seda.

3.1 Estrutura do nervo periférico e lesão nervosa

Os componentes do sistema nervoso periférico (SNP, de ora em diante) são os nervos, os gânglios e as terminações nervosas. Os nervos são feixes esbranquiçados constituídos de fibras nervosas e envolvidos por tecido conjuntivo (TORTORA; NIELSEN, 2013). As fibras nervosas são constituídas por um axônio e suas bainhas envoltórias são constituídas de células de Schwann, diferente do Sistema Nervoso Central (SNC, deste ponto em diante) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; STANDRING, 2008).

Os axônios do SNP em geral possuem pequeno diâmetro e são envolvidos por uma única dobra da célula envoltória em detrimento aos axônios mais calibrosos que, quanto maiores, mais envoltórios possuem. O conjunto desses envoltórios chama-se bainha de mielina (Figura 1) e suas fibras são as fibras nervosas mielínicas. Nem todos os axônios são recobertos por mielina, embora as fibras amielínicas periféricas sejam também envolvidas pelas células de Schwann (Figura 2), mas, neste caso, não ocorre o enrolamento em espiral (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; KIERSZENBAUM, 2008; TORTORA; NIELSEN, 2013).



Figura 1 – As quatro fases sucessivas da formação de mielina pela membrana da célula de Schwann (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

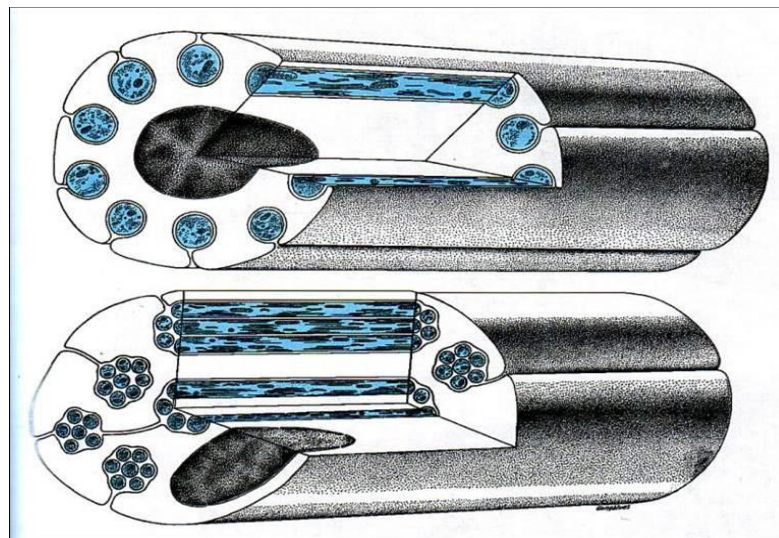


Figura 2 - Fibra amielínica, na qual cada axônio tem seu próprio mesaxônio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os axônios dos nervos periféricos são agrupados em feixes paralelos, denominados fascículos; esses, por sua vez, são revestidos por bainhas de tecido conjuntivo frouxo, as quais fornecem suporte ao processo de regeneração axonal. Assim sendo, revestindo cada axônio individualmente, tem-se o endoneuro. Os feixes de axônios ou de fascículos são revestidos pelo perineuro, que contém também fibroblastos, adipócitos e células do sistema imune como, macrófagos, mastócitos e linfócitos. Já na camada mais superficial que envolve o nervo como um todo, tem-se o epineuro. As bainhas conjuntivas conferem grande resistência aos nervos, sendo

mais espessas nos nervos superficiais, pois esses são mais expostos aos traumatismos (Figura 3) (SIQUEIRA, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; CHACHA et al., 2009, TOPP et a., 2012; TORTORA; NIELSEN, 2013).

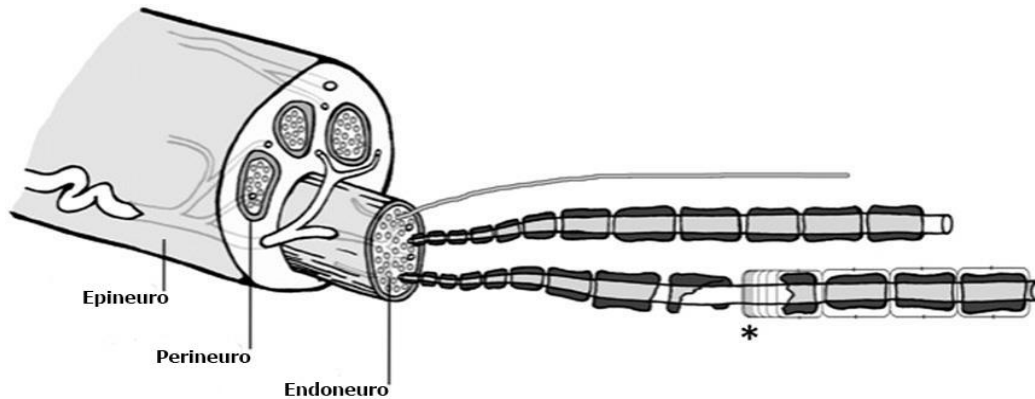


Figura 3 – Tecido conectivo do nervo periférico (TOPP; BENJAMIM et al., 2012).

No que diz respeito à anatomia do nervo isquiático humano, ele é formado pelas raízes nervosas ventrais que emergem da medula espinal, no nível da 4^o vértebra lombar (L4) até a 3^o vértebra sacral (S3), sendo o maior nervo do corpo humano em diâmetro, com cerca de dois centímetros de largura na porção proximal. Ele emerge da pelve por meio do forame isquiático maior, passa abaixo do músculo piriforme, desce entre o trocânter maior do fêmur e a tuberosidade isquiática, percorre o dorso da coxa, anterior aos músculos bíceps femoral e semitendíneo, desce até o seu terço inferior, onde se divide em dois grandes ramos denominados nervo tibial e nervo fibular comum (Figura 4) (FONSECA et al., 2002; DISTAD; WEISS, 2013).

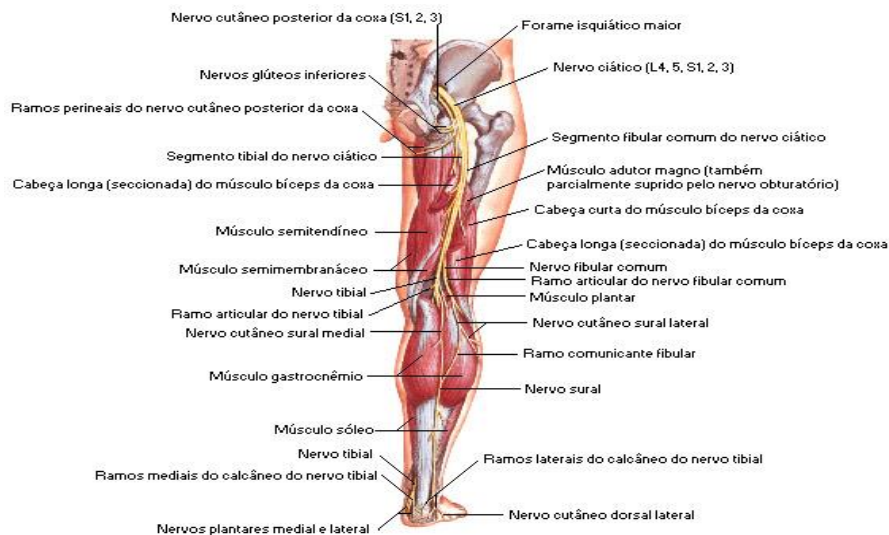


Figura 4 - Vista Posterior das musculaturas do membro inferior direito e do nervo isquiático. Fonte: NETTER, Frank H.. Atlas de Anatomia Humana. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

Em ratos, o nervo isquiático origina-se nos segmentos L4-L6 da medula espinhal (Figura 5), e é unifascicular até o trocânter do fêmur. Após esse ponto divide-se em duas porções, a tibial, dando origem ao nervo tibial, e sural e fibular que dá origem ao nervo fibular e a um ramo cutâneo responsável por inervar a face proximal e lateral do tríceps sural, apresentando, então, características similares a do nervo isquiático de humanos (SCHMALBRUCH, 1986; DURAKU, et al., 2012).

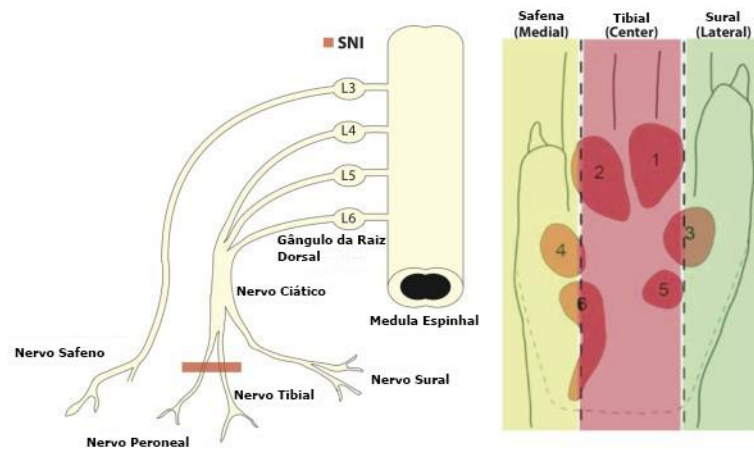


Figura 5 – Ilustração da origem e continuidade do nervo isquiático do rato (DURAKU et al., 2012).

O SNP é suscetível a diversos tipos de lesões, que podem advir de diversas causas, dentre as lesões traumáticas destacam-se os esmagamentos, a compressão, o estiramento, a avulsão, a secção parcial ou total, podendo resultar em comprometimento funcional, secundário ao déficit da transmissão dos impulsos nervosos (MONTE-RASO et al., 2006). Entre as não traumáticas, encontram-se as infecções virais, as afecções inflamatórias, a exposição a toxinas, os distúrbios metabólicos, os tumores, as doenças autoimunes, as diabetes e algumas neuropatias hereditárias (SILVA; CAMARGO, 2010; SCHEAFER; UBINGER, 2013). Os nervos ainda podem sofrer com condições físicas adversas, como exposição ao frio, à corrente elétrica e à radiação (SILVA; CAMARGO, 2010).

Segundo Kendal et al. (2007), os traumas ainda podem ser divididos em súbitos ou graduais, sendo o segundo o resultado de posições mantidas e movimentos repetitivos, o mesmo pode ser disseminado por um membro ou localizado em um único ramo nervoso, podendo ainda ser transitório ou resultar em disfunções permanentes.

Entender a classificação das lesões nervosas periféricas é de suma importância por estar relacionada ao prognóstico e à determinação do tratamento

(MAZZER et al., 2006). Dentro da classificação da lesão nervosa periférica existem duas principais que são descritas pela literatura, segundo seus pesquisadores precursores. A primeira delas foi descrita por Seddon, em 1943, que definiu três diferentes graus para as lesões nervosas: neuropraxia, axonotmese e neurotmese (Figura 6).

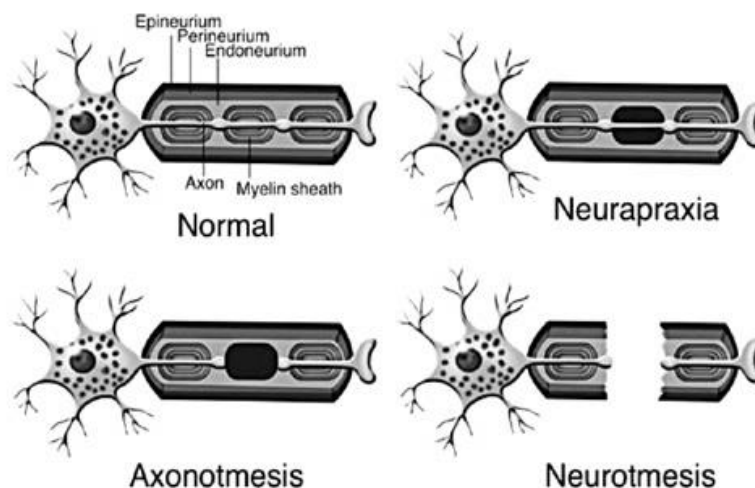


Figura 6 - Graus de lesões nervosas (MARTINS et al., 2013)

1) Neuropraxia – a forma mais branda de uma lesão nervosa é caracterizada unicamente pela interrupção da condução nervosa, na qual existe um bloqueio transitório dos estímulos nervosos; o axônio não perde sua continuidade; 2) Axonotmese – os danos são suficientes para promover uma ruptura da continuidade axonal, provocando uma degeneração Walleriana distal a lesão. Nesse tipo de lesão não ocorre perda de célula de Schwann, e a recuperação dependerá do grau de desorganização do nervo e também da distância do órgão terminal (SIQUEIRA, 2007; PURVES et al., 2010); 3) Neurotmeese – ocorre quando há um bloqueio da condução nervosa com transecção completa do nervo, sendo essa a forma mais grave de lesão nervosa sem recuperação funcional espontânea, devido à associação com a laceração do tecido; é a lesão que tem o pior prognóstico na recuperação clínica (DOURADO et al., 2003; MAZZER et al., 2006; SILVA; CAMARGO, 2010).

A segunda classificação foi estabelecida por Sunderland (1951), que caracterizou a lesão nervosa periférica em cinco graus (Figura 7). Grau I - ocorre lesão da bainha de mielina, com bloqueio temporário da condução nervosa, mantendo a integridade da estrutura nervosa; Grau II - com lesão axonal parcial, degeneração Walleriana; porém, com integridade da lâmina basal; Grau III - com lesão axonal

parcial e fragmentação da lâmina basal; Grau IV - com lesão de endoneuro, perineuro e lâmina basal; Grau V - com lesão axonal completa do tronco nervoso.

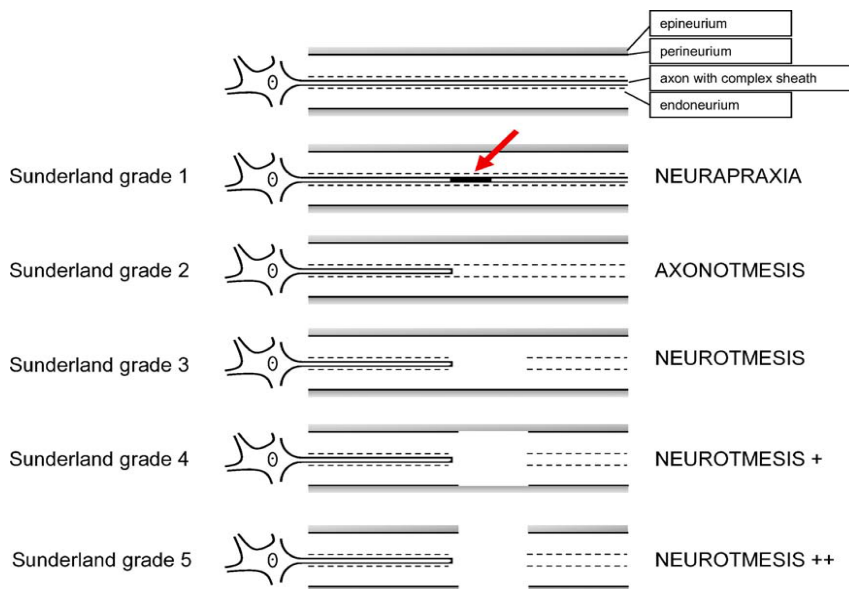


Figura 7 - Representação esquemática dos cinco graus de lesão do nervo de acordo com Sunderland. A seta vermelha indica o bloqueio de condução (DEUMENS et al., 2010).

O modelo de esmagamento do nervo isquiático utilizado no presente estudo reproduziu de forma fidedigna uma lesão do tipo axonotmese (BRIDGE et al., 1994; CAMPBELL, 2008). Além da perda da condutividade nervosa, ela acarreta a perda da transmissão neuromuscular (BOSSE; KÜRY; MÜLLER 2001), acometendo assim os músculos por ele inervado. Ainda segundo Geuna et al. (2015), o nervo isquiático de ratos é muito utilizado devido à sua característica morfológica, bem como fácil acesso cirúrgico e por possuir dados prévios para comparação.

3.2 Músculo esquelético estriado

O tecido muscular esquelético é um dos mais dinâmicos e plásticos do corpo humano. Compreende aproximadamente 40% do peso corporal total e contém 50-75% de toda proteína corporal. No geral, a massa muscular depende do balanço entre a síntese protéica e a degradação, e ambos os processos são sensíveis para fatores como estado nutricional, balanço hormonal, exercício físico, lesão ou doença entre outros (FRONTERA; OCHALA, 2014).

O músculo esquelético é constituído por células alongadas que contêm grandes quantidades de filamentos citoplasmáticos de proteínas contráteis, geradoras das forças necessárias para contração muscular, utilizando a energia contida na molécula de trifosfato de adenosina (ATP). As células musculares têm origem mesodérmica, e a sua diferenciação ocorre pela síntese de proteínas filamentosas, concomitante com o alongamento das células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TORTORA; NIELSEN, 2013).

Certos elementos das células musculares recebem nomes específicos, como a membrana celular denominada de Sarcolema; o citosol de Citoplasma e o retículo endoplasmático liso de Retículo sarcoplasmático (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BOFF, 2008).

O tecido muscular esquelético é formado por feixes de células longas (até 30 cm), cilíndricas, multinucleadas e contendo inúmeros filamentos, as miofibrilas. Já o diâmetro das fibras musculares estriadas varia de 10 a 100 μm . Essas fibras têm origem no embrião pela fusão de células alongadas, os mioblastos (SILVA et al., 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BOFF, 2008; FRONTERA; OCHALA, 2014).

Como no sistema nervoso periférico, o músculo esquelético estriado possui sua organização estrutural músculo-esquelética bem definida. Assim sendo, as fibras musculares estão organizadas em grupos de feixes, tendo o conjunto de feixes envolvido por uma camada de tecido conjuntivo, chamada epimísio, que recobre o músculo inteiro (TORTORA; NIELSEN, 2013; FRONTERA; OCHALA, 2014; SHADRIN, KHODABUKUS, BURSAC, 2016).

Do epimísio partem finos septos de tecido conjuntivo, que se dirigem para o interior do músculo, separando o feixe; esses septos constituem o perimísio. Por conseguinte, o perimísio envolve feixes de fibras. Cada fibra individualmente é envolvida pelo endomísio, que é formado pela lâmina basal da fibra muscular associada a fibras reticulares. O tecido conjuntivo mantém as fibras musculares unidas, permitindo que a força gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TORTORA; NIELSEN, 2013; SHADRIN, KHODABUKUS, BURSAC, 2016).

O arranjo sistemático das miofibrilas é responsável pelas estriações transversais, quando montados em conjunto, de uma forma muito ordenada, os miofilamentos formam os sarcômeros, que constituem a unidade contrátil fundamental

da fibra muscular (FRONTERA; OCHALA, 2014; SHADRIN, KHODABUKUS, BURSAC, 2016).

As faixas escuras dos sarcômeros são denominadas bandas A (anisotrópicas à luz polarizada), e as faixas claras denominadas bandas I (isotrópicas à luz polarizada). Na região central da banda A, pode-se observar uma delgada faixa mais clara, a banda H, formada somente pelos filamentos espessos. Na zona central da banda H, observa-se a linha M, formada por um arranjo hexagonal de proteínas que ligam filamentos espessos adjacentes. A Banda I é dividida por uma linha escura, o disco Z. A região da miofibrila, localizada entre dois discos Z, forma um sarcômero, com cerca de 2,5 μm de comprimento. A banda I é constituída somente pelos filamentos finos, que se estendem da linha Z até o início da Banda H. Os principais componentes da banda A são os filamentos espessos, localizados na região central do sarcômero. Já os limites laterais do sarcômero são dados pelo disco Z, constituídos por alfa-actinina, onde se ancoram os filamentos finos, a titina e a nebulina (Figura 8) (FERREIRA, 2005; SILVA et al., 2007; BOFF, 2008; TORTORA; NIELSEN, 2013; ESTRELLA; NAYA, 2014).

Os dois filamentos mais abundantes do tecido muscular esquelético são actina e miosina, que representam cerca de 70-80% do teor total de proteína de uma única fibra muscular. Contudo, o sarcômero e o sarcoplasma contêm muitas outras proteínas que contribuem para a estrutura do citoesqueleto, excitação, acoplamento e contração muscular, liberação de energia e geração de força (FRONTERA; OCHALA, 2014).

De particular importância são as proteínas reguladoras, troponina e tropomiosina, que possuem um papel importante na ativação do processo de contração muscular. Outras proteínas contribuem para a atividade fisiológica e para as propriedades mecânicas do músculo esquelético como, Titina e Nebulina (FRONTERA; OCHALA, 2014). Essas proteínas contribuem para a integridade do sarcômero, influenciam na tensão passiva e rigidez, e podem ser relevantes na sinalização celular (FRONTERA; OCHALA, 2014).

Com a ajuda do microscópio eletrônico pode-se observar a presença dos filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina, que estão dispostos longitudinalmente nas fibrilas e organizados numa distribuição simétrica e paralela (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BOFF, 2008).

Organização da fibra muscular

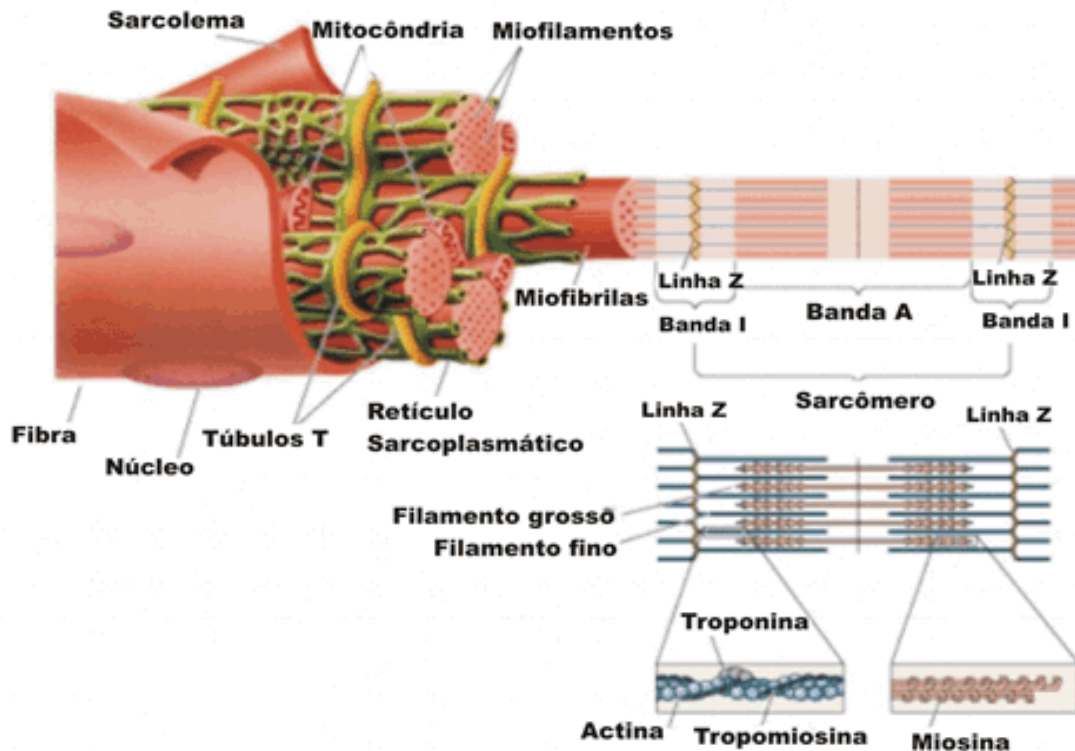


Figura 08 - Diagrama ilustrativo: Estrutura do músculo esquelético. Acesso: 16/10/2017. <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio22.php>

O tecido muscular em si é constituído basicamente de dois grandes grupos de fibras musculares: as vermelhas, tipo I (predominância de fibras lentas), com prevalência do metabolismo aeróbico. Sua coloração característica se dá pela presença de um pigmento respiratório, a mioglobina, que se liga às moléculas de oxigênio, provenientes do interior dos capilares sanguíneos que irrigam os músculos esqueléticos; já as fibras brancas, tipo II (predominância de fibras rápidas), têm preponderância do metabolismo anaeróbico (BOFF, 2008; BICUDO et al., 2013). Ela, tem baixo percentual de mioglobina, não dependendo de fluxo contínuo e prolongado de oxigênio; sua vascularização é menor e o número de mitocôndrias também (BOFF, 2008; YAN et al., 2010; BICUDO et al., 2013).

No entanto, existem ainda subtipos de fibras rápidas que se subdividem em IIa, sendo uma fibra rápida intermediária, IIb, a mais rápida com predominância no metabolismo glicolítico; porém, mais fatigável que a IIa, e a IIc, também de contração rápida, apresentando características histoquímicas e bioquímicas similares as fibras IIx, descritas em ratos, camundongos e coelhos (SILVA et al., 2007; PIOVESAN et al., 2009; YAN et al., 2010; BICUDO et al., 2013).

Do ponto de vista morfológico, essas fibras musculares são diferentes entre si porque as moléculas de miosina que as compõem são diferentes, denominadas, isoformas de miosina de cadeia pesada. Assim como a quantidade de células que as contêm varia de acordo com a função e cada tipo de trabalho realizado pelo músculo (PIOVESAN et al., 2009; BICUDO et al., 2013), cada músculo do corpo é composto por uma mistura dessas fibras musculares com suas diferentes graduações (GUYTON, 2006; BOFF, 2008).

As fibras musculares do músculo esquelético estriado, quando estimuladas eletricamente pela parte somática do sistema nervoso, mais especificamente pelos motoneurônios alfa, que se prolongam para fora do tronco encefálico e medula espinal até a sinapse química (junção neuromuscular), responsável pela inervação do músculo esquelético estriado, geram um processo denominado contração muscular. Esse processo é definido como a ativação das fibras musculares com tendências a se encurtarem (TORTORA; NIELSEN, 2013). Esse impulso libera neurotransmissores chamados de acetilcolina; esses, por sua vez, se ligam aos seus receptores na membrana sarcoplasmática, causando a despolarização da mesma por meio de influxo de sódio (TORTORA; NIELSEN, 2013).

A despolarização se propaga da superfície para o interior da fibra por meio de invaginações chamadas de túbulos-T. Junto aos túbulos se encontram as cisternas do retículo sarcoplasmático formando com o túbulo T uma estrutura denominada tríade. Na membrana dos túbulos encontram-se proteínas integrais que a penetram; são chamadas proteínas DHP (dihidropiridina) por terem afinidade por dihidropiridina, uma substância inibidora da abertura de seus canais de cálcio (FERREIRA, 2005; FERNANDES et al., 2008; TORTORA; NIELSEN, 2013; CSERNOCH e VINCENT, 2015; SHADRIN, KHODABUKUS, BURSAC, 2016).

A despolarização do túbulo T induz a alteração conformacional das proteínas DHP. Essa mudança estrutural é transmitida aos podócitos (projeções citoplasmáticas) que se encontram em contato com tais proteínas, chamadas Proteínas Receptoras de Rianodina (RyR1). Essas proteínas se encontram concentradas na face da cisterna em contato com o túbulo T e contêm canais íntimos seletivos ao cálcio. Uma vez ativado pela alteração da conformação da proteína o RyR1, abre seus canais devido ao efluxo de cálcio do retículo para o citoplasma da

fibra muscular (FERREIRA, 2005; MILJKOVIC et al., 2015; SHADRIN, KHODABUKUS, BURSAC, 2016).

A alteração conformacional de RyR1 se transmite à outra proteína ligada a esse receptor, chamada Triadina. Essa, por sua vez, mobiliza o cálcio ligado à Parvalbumina, à Calsequestrina e à Reticulina, todas encontradas no interior do retículo sarcoplasmático e em contato entre si, liberando mais cálcio. Esses saem pelo canal de RyR1, o qual se encontra aberto fazendo com que haja um aumento do cálcio sarcoplasmático (FERREIRA, 2005; TORTORA; NIELSEN, 2013; REBBECK et al., 2014).

Isso faz com que haja uma ativação das proteínas musculares, que são compostas por proteínas contráteis, filamentos espessos de miosina e filamentos finos de actina, e proteínas reguladoras, compostas por troponina e suas subunidades, troponina C (TnC, que tem afinidade por cálcio), troponina I (TnI) com propriedade inibitória e tem afinidade pela actina, e troponina T (TnT), que se liga à tropomiosina (SILVA et al., 2007; TORTORA; NIELSEN, 2013).

O cálcio, ao se ligar à TnC, faz com que o conjunto modifique a sua conformação desligando então a TnI, simultaneamente deslocando a Tropomiosina, expondo, assim, os sítios das actinas globulares (Act-Gs), permitindo a interação com as projeções das cadeias de miosina, chamadas de cabeça, que se combinam com a actina e com Adenosina Trifosfato (ATP), que se decompõe em Adenosina Difosfato (ADP) + Pi (fósforo inorgânico), gerando energia e produzindo o movimento da cabeça da miosina. Com isso, tem-se então o deslizamento dos filamentos finos em relação aos filamentos grossos, formando as pontes cruzadas (actina-miosina) com consequente encurtamento dos sarcômeros (aproximação dos discos Z), e produção de força ao longo da miofibrila, caracterizando a contração do músculo (FERREIRA, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; REBBECK et al., 2014; MILJKOVIC et al., 2015).

O Ciclo de contração se repete à medida que a enzima que catalisa a decomposição do ATP (ATPase) hidrolisa a molécula recém-ligada do ATP e continua enquanto o ATP estiver disponível e o nível de cálcio próximo do filamento fino for suficientemente alto. Conforme se encurtam, as fibras tracionam seus revestimentos de tecido conjuntivo e tendões, que se esticam e se tornam retesados, e a tensão passada pelos tendões traciona os ossos aos quais estão fixados, resultando em

movimento de uma parte do corpo que permite a realização de tarefas (TORTORA; NIELSEN, 2013.)

Quando um músculo esquelético se contrai, traciona um dos ossos da articulação em direção ao outro. Esse mecanismo de tração por alavancas é possível devido à fixação dos mesmos aos ossos, pelos tendões, por meio das suas extremidades fixadoras, da origem e da inserção dos músculos (TORTORA; NIELSEN, 2013).

Sendo assim, o músculo plantar origina-se no côndilo lateral do fêmur, inserindo-se no calcâneo (tendão do calcâneo) (NETTER, 2000). É innervado pelo nervo tibial (lombar 4 – sacral 1). É um músculo pequeno e pode não existir ou ser duplo em cada perna (Figura 9) (ABRAHAMS, 2011; TORTORA; NIELSEN, 2013). É composto predominantemente na sua porção profunda, por fibras brancas, com pouca resistência à fadiga e de contração rápida, pois sua demanda funcional faz com que suas fibras sejam ativadas de maneira intermitente durante a marcha (ROY et al., 1997; FULLER et al., 2006).



Figura 9 - Músculos do membro pélvico esquerdo do rato, ênfase no músculo plantar - Vista posterior (dissecação superficial). Acesso em: 14/02/17 - <http://slideplayer.com/slide/download/>.

A função do músculo plantar no corpo humano é auxiliar na estabilização do joelho (propriocepção), atuando como coadjuvante na flexão plantar do tornozelo e na flexão da articulação do joelho (SPINA, 2007). No rato, auxilia no suporte do peso do animal, não apenas durante a atividade locomotora (marcha), mas também no suporte estático (FRISCHKNECHT, BELVERSTONE e VRBOVÁ, 1995). Woittiez, Huijing e Rozendal (1985) descrevem que o músculo possui predominantemente fibras de contração rápida. O músculo representa em média 12,5% do peso quando correlacionado ao complexo de músculos superficiais da panturrilha, com área da secção transversal representando cerca de 14% e representa 15% da força ativa máxima.

Tendo em vista que o músculo esquelético estriado depende de estímulo nervoso (elétrico) (TINTIGNAC et al., 2015) para que sua contração ocorra de maneira eficiente, fica explícita a necessidade de conhecer as consequências fisiopatológicas acerca dos efeitos da desnervação sobre a morfologia e a funcionalidade do músculo

supracitado, sendo de fundamental importância para o entendimento da causa e posterior intervenção terapêutica.

3.3 Junção neuromuscular

A atividade contrátil do músculo esquelético é regulada pelo sistema nervoso central, por meio da transmissão de potenciais de ação advindo dos neurônios motores às fibras musculares. Tanto o axônio motor pré-sináptico quanto a fibra muscular esquelética pós-sináptica são altamente especializadas na JNM, garantindo, assim, uma transmissão eficiente do potencial de ação (TINTIGNAC et al., 2015).

Essa transmissão que ocorre em uma sinapse química altamente especializada, a junção neuromuscular (JNM) ou placa terminal motora. Por conseguinte, o comprometimento da função da JNM resulta em fraqueza muscular ou paralisia, prejudica os gatilhos existentes que realizam sinalização no músculo esquelético, levando, em última instância, à perda de massa muscular grave (TINTIGNAC et al., 2015).

As JNMs não se desenvolvem em locais aleatórios no músculo, pelo contrário, se desenvolvem numa zona central estreita da fibra muscular de modo que, muitas JNMs, estão localizadas em uma fileira, formando uma placa terminal na fibra (FERRARO, MOLINARI, BERGHELLA, 2012; TORTORA; NIELSEN, 2013). Possui três elementos estruturais principais: a região pré-sináptica, onde se encontra o terminal do nervo parcialmente envolto por células de Schwann; a fenda sináptica, ocupada pela lâmina basal; e a região pós-sináptica, integrada pela membrana pós-sináptica especializada do músculo (HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006; TORTORA; NIELSEN, 2013).

No entanto, a forma e o tamanho do terminal axonal, bem como a complexidade das membranas pré e pós-sinápticas da JNM, variam entre os diferentes tipos de fibras musculares (OGATA, 1988).

Região pré-sináptica

Antes de atingirem a região pré-sináptica, os axônios são envoltos por bainha de mielina, os chamados axônios pré-terminais. Ao encontrar o músculo, ramificam-

se por todo tecido conjuntivo intramuscular e passam a ser chamados de axônios terminais (CARMIGNOTO et al., 1983; HALL e SANES, 1993; TINTIGNAC et al., 2015).

A região pré-sináptica possui algumas estruturas características como o terminal nervoso, onde se encontram as vesículas sinápticas que são sintetizadas nos corpos dos motoneurônios. As vesículas se encontram nas zonas ativas que correspondem à parte interna da membrana pré-sináptica, onde se fundem à membrana do terminal nervoso e liberam acetilcolina na fenda sináptica, transportadas pelos axônios até o terminal (HALL e SANES, 1993; SANES e LICHTMAN, 1999; LIEBER, 2002, RUFF, 2003). Sua função é estocar e liberar acetilcolina, além de possuir mitocôndrias que dão suporte ao seu funcionamento (HALL e SANES, 1993; HUGHES, KUSNER e KAMINSKI, 2006).

Outro importante elemento da região pré-sináptica são as células de Schwann, que emitem processos que envolvem o terminal nervoso dos motoneurônios com intuito de protegê-los de possíveis lesões químicas e mecânicas (HALL; SANES, 1993; SANES; LICHTMAN, 1999).

Fenda Sináptica

A JNM possui duas fendas sinápticas: a primária, que compreende o espaço determinado entre o terminal nervoso e a fibra muscular, sendo preenchida pela lâmina basal sináptica; e a secundária, formada pelo espaço entre as dobras juncionais do sarcolema pós-sináptico e a lâmina basal (SANES, 2003). A fenda sináptica possui uma membrana basal que se prolonga até as dobras juncionais e se acopla à membrana basal das células de Schwann. Extremamente especializada, a membrana basal sináptica possui proteínas em sua matriz extracelular, que coordenam a síntese e a concentração da acetilcolinesterase pós-sináptica, proteína de suma importância no processo de contração e relaxamento muscular (HALL e SANES, 1993; RIBCHESTER, 2009; TINTIGNAC et al., 2015).

Região Pós-sináptica

Os componentes da região pós-sináptica são requeridos para otimizar a transmissão dos sinais químicos advindos do terminal nervoso para realizar a contração muscular após liberação da acetilcolina (HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006; TINTIGNAC et al., 2015).

A região pós-sináptica é composta por algumas estruturas, como o sarcolema, que contém dobras juncionais formadas pelo seu pregueamento para aumentar a superfície, conseqüentemente, aumentando a eficácia da transmissão sináptica (MARQUES et al., 2000). Essas dobras juncionais possuem receptores de acetilcolina (RACHs), canais de sódio e moléculas de adesão neuronal (NCAM) HALL; SANES; RUFF, 2003; TINTIGNAC et al., 2015). A NCAM é uma proteína exclusivamente encontrada nas JNMs adultas, exceto quando ela encontra-se em processo de regeneração. Nesse processo, a expressão da NCAM é aumentada, estimulando o brotamento axonal e reconexão nervo-músculo (IDE, 1996; WALSH et al., 2000).

3.4 Junção neuromuscular e desnervação

A preservação da JNM é importante para manter a massa muscular. Conforme Deschenes et al. (2003), a JNM demonstra uma impressionante plasticidade quando submetida a alterações neuromusculares, mesmo em animais adultos, sendo que uma abrupta e completa paralisação da atividade neuromuscular por meio da desnervação ou lesão por neurotoxinas modulam sua estrutura e função.

A desnervação ou o mau funcionamento de transmissão da JNM resulta em perda de massa muscular. Esse baseia-se na ativação ou na inibição de vias específicas de sinalização, como, por exemplo, as vias MuRF-1 e MAFbx, identificadas como ubiquitina ligases E3, que são vias proteolíticas e se encontram aumentadas no músculo esquelético sob condições de atrofia muscular, tornando-se excelentes marcadores de atrofia (BODINE et al., 2014).

As JNMs estão sujeitas a remodelações, devido a diversos fatores: idade (BARKER; I.P, 1965; ANDONIAN; FAHIM, 1987; FAHIM, 1997; PRZYBYLA, 2005),

compressões, esmagamentos e secções traumáticas de nervos periféricos, pancadas ou quedas (Figura 10) (GATTUSO et al., 1988), grau de atividade neuromuscular (ROBBINS, 1986; DESCHENES, 1993; FAHIM, 1997), algumas doenças congênitas, como Miastenia Graves (MG) e Síndrome de Lambert-Eaton, além de várias formas de intoxicação, sendo uma delas o botulismo (KALAMIDA et al., 2007, MAHADEVA et al., 2008; TINTIGNAC et al., 2015).

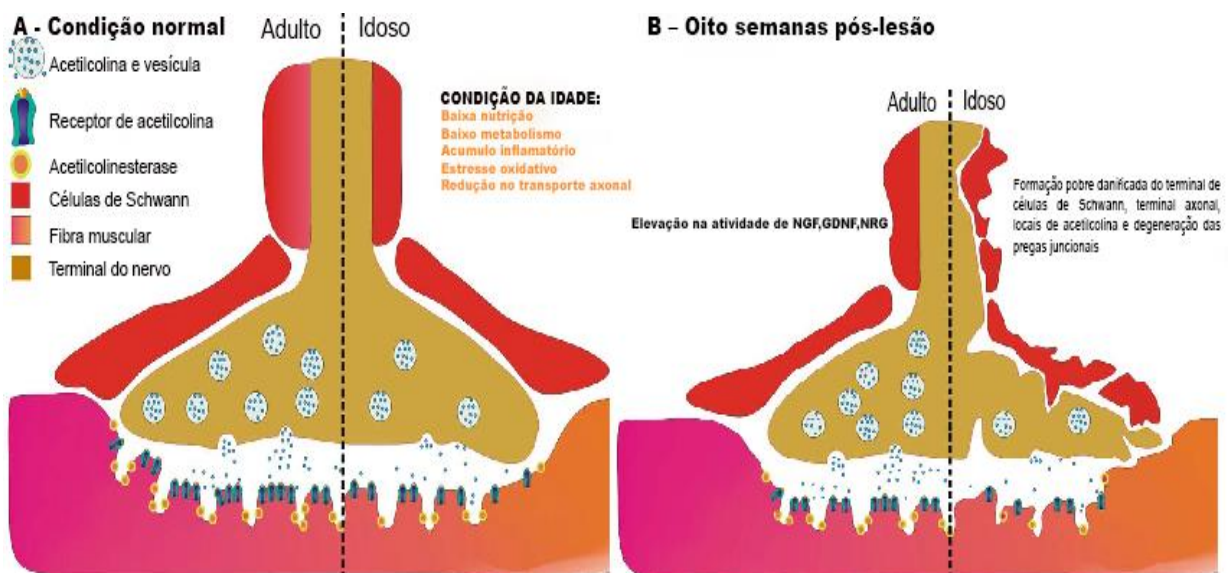


Figura 10 – Diagrama esquemático, representando contato nervo-músculo pela junção neuromuscular, condição normal (A) e oito semanas pós lesão (B). (A) – estrutura morfofisiológica normal. (B) observa-se danos e pobre formação do terminal de células de Schwann, terminal do axônio, locais de acetilcolina e degeneração das dobras juncionais, adaptado de (KAWABUCHI, TAN, WANG et al., 2011).

As reorganizações que ocorrem na estrutura das JNMs podem estar relacionadas às modificações no seu tamanho, no comprimento e na dispersão das vesículas sinápticas e seus devidos receptores (ANDONIAN, 1988; WAERHAUG, 1992; DESCHENES, 1993; FAHIM, 1997; DESAULNIERS, 1998; DESCHENES, 2000).

Matsuda et al. (1988) estudaram as JNMs do músculo fibular longo de Hamsters após diferentes períodos de desnervação (2, 4, 8 e 16 semanas) e reinervação (4, 10 e 20 semanas). Observaram a restauração dos sulcos sinápticos e aumento das dobras juncionais, além de uma organização estrutural e recuperação do aparelho subneural.

Segundo Torrejais et al. (2009), analisando a morfometria e morfologia das JNMs de diafragmas de ratos novergicos desnervados em diferentes períodos, constataram algumas modificações na morfologia das JNMs, tais como a degeneração do citoplasma juncional e ranhuras sinápticas profundas com escavações periféricas que abrigam os botões terminais do nervo. As JNMs, após a desnervação, se apresentaram menores e com aspecto alongado, possuindo contornos menos visíveis, além da distribuição irregular das dobras juncionais.

Sabe-se ainda que após a lesão nervosa é possível observar alterações nos receptores de acetilcolina (RACHs), em que na fase inicial do desenvolvimento RACHs revestem toda fibra muscular e incorporam o sarcolema. A partir do contato do nervo com a fibra muscular, os receptores se aglomeram nesse local de contato, levando à diminuição do número de receptores extrajuncional e ao seu aumento juncional. A desnervação causa inversão desse processo, aumentando o número de receptores extrajuncionais no músculo e tornando-o mais receptivo à reinervação (LIEBER, 2002).

3.5 Lesão nervosa e seus efeitos sobre o músculo

Sabe-se que a LNP pode resultar em diversas implicações, desde sensoriais e autonômicas, incluindo paresias e plegias, geram hipotrofias, bem como retrações teciduais, dor e edema, parestesias, limitações funcionais além de complicações motoras deletérias advindas de um déficit de comunicação entre nervo e músculo (SILVA; CAMARGO, 2010).

Assim, o órgão inervado pelo nervo lesionado, está sujeito à ocorrência de atrofia em um período variável de semanas a meses após a lesão, dependendo do grau de reinervação. Além disso, a denervação prolongada leva à degeneração irreversível das bainhas dos nervos intramusculares (SILVA; CAMARGO, 2010).

Embora ocorram diversas alterações funcionais, em decorrência da LNP, a atrofia muscular é a mudança mais incisiva encontrada após a lesão e varia notadamente entre acometidos da mesma espécie e entre músculos do mesmo indivíduo (SIQUEIRA, 2007). De acordo com Carlson (2014), a atrofia se torna mensurável em poucos dias, mas em músculos lentos, como o sóleo, ocorre mais rapidamente. Nunes e Mello (2005) realizaram lesão por secção no nervo isquiático e

observaram que a atrofia no músculo sóleo foi evidente após o 3º dia de lesão e substancialmente maior no 7º dia.

Caso a desnervação permaneça, dentro de dois anos, as fibras podem fragmentar e desintegrar. Nesse caso, verifica-se, no primeiro e segundo meses, uma perda da massa muscular de 30% a 60%, e com a continuidade essa perda chega de 60% a 80% em 4 meses (SIQUEIRA, 2007).

A atrofia por desnervação pode ser classificada em três estágios, segundo Muscatello, Margreth, Aloisi (1965) após estudarem o músculo semitendíneo de rãs, devido à lesão nervosa periférica por secção do nervo isquiático e femoral. No primeiro estágio (fase de retardo), o músculo perdeu menos de 5% de massa e com a permanência da lesão a massa muscular diminuiu de 5 a 25%, iniciando assim a 2ª fase (1 a 3 meses pós lesão), na qual se pode constatar redução das proteínas contráteis (proteólise) e aumento da concentração dos componentes estruturais do retículo sarcoplasmático. Concluindo, em uma fase mais avançada (atrofia degenerativa), há redução da massa muscular, acima de 30%, associada a alterações no sarcoplasma. Os autores descrevem que os estágios iniciais da atrofia, no músculo semitendíneo de rãs, condizem a um período de algumas horas ou dias em mamíferos como os ratos. No entanto, em humanos, a atrofia, a proliferação de tecido conjuntivo e a substituição por tecido adiposo ocorrem de maneira mais lenta (KERN et al., 2002).

Segundo Colli (1993), as estruturas dos miócitos começam a reduzir em diâmetro, devido à diminuição no número e no tamanho das miofibrilas. Elas vão retraindo-se e perdendo gradativamente a sua capacidade de contração, dando lugar ao processo de atrofia. Ainda, ao final de 18 meses, o músculo poderá estar completamente substituído por tecido conjuntivo cicatricial, caracterizando o processo permanente de fibrose.

Outras alterações também ocorrem, como, por exemplo, a redução drástica no número das células satélites por apoptose (KUJAWA; BARAN; JANKOWSKA-STEIFER, 2005) e a diminuição no número de sarcômeros (CEYLAN et al., 2014).

Dependendo do grau da lesão nervosa, o processo progressivo de degeneração muscular pode estabilizar-se, caso a desnervação for incompleta ou não e do grau de reinervação espontânea que está ocorrendo (normal ou aberrante), e também da possível inervação contralateral (COLLI, 1993).

Segundo Minamoto (2007), as proteínas musculares possuem meia-vida em torno de 7 a 10 dias; entretanto, a interrupção do estímulo contrátil, devido à desnervação, leva à diminuição da síntese e ao aumento da degradação protéica, conseqüentemente, diminuindo a meia-vida da proteína para um período inferior a 7 dias, acarretando na diminuição da massa muscular. Esse balanço protéico que determina a plasticidade da fibra muscular ocorre no sarcômero, a unidade funcional do músculo.

Além dessas alterações provocadas pela desnervação, a ausência do estímulo nervoso acarreta a diminuição da isoforma lenta da cadeia pesada de miosina, com conseqüente aumento proporcional da cadeia pesada de miosina rápida (MINAMOTO, 2007).

Após 30 dias de desnervação, a porcentagem de fibras rápidas do tipo IIB aumentam de 4% para 9%, bem como as fibras do tipo IIX, que aumentam de 13% para 23%. Entretanto, as fibras do tipo IIA e do tipo I diminuem de 42% para 32% e de 41% para 36%, respectivamente, demonstrando que a diminuição da atividade provoca alteração da fibra no sentido lenta para rápida (LIEBER, 2002; MINAMOTO, 2007).

Além disso, observam-se também modificações na excitabilidade muscular. A energia necessária para excitar o músculo e a duração do pulso para produzir a contração tornam-se maiores (RUSSO et al., 2004).

Dentro do que foi exposto acerca das conseqüências deletérias da desnervação sobre o músculo esquelético estriado, há consenso na literatura que a inervação é fundamental para a manutenção das propriedades físicas e plasticidade dos diferentes tipos de fibras musculares (MINAMOTO, 2007).

No que tange à plasticidade neuromuscular, sabe-se que a musculatura esquelética possui a capacidade de se regenerar rapidamente, mesmo após danos considerados severos (FERNANDES et al., 2008).

A desnervação muscular leva a fibra muscular à atrofia, à fibrose e ao alargamento transitório do leito capilar intramuscular, causando um aumento no volume de sangue do músculo e conseqüentemente aumento do fluído extracelular, além do aumento da proteólise. Felizmente, o músculo esquelético é capaz de extensiva regeneração por meio da ativação de células satélites (KÄÄRIÄINEN; KAUKANEN, 2012; RANDOLPH; PAVLATH, 215).

Dentro desse contexto, fatores de transcrição chamados de Fatores de Regulação Miogênica (MRF), incluindo Fator de Diferenciação Miogênica (MyoD), Fator Miogênico 5 (Myf5), miogenina e Fator de regulação miogênica 4 (MRF-4), transformam as células mesodermiais em mioblastos, após transformam-se em miócitos (célula mononucleada), conseguinte essas células se fundem para formar miotubos, após diferenciam-se caracterizando a fibra muscular multinucleada (DAL PAI SILVA e CARVALHO, 2007; BOFF, 2008; SHADRIN, KHODABUKUS, BURSAC, 2016).

Esses mesmos fatores são responsáveis por regular a ativação das células satélites (CS), as quais se encontram na periferia (entre a lâmina basal e sarcolema) da célula muscular, cuja importância se faz no crescimento e na regeneração muscular (FERNANDES et al., 2008; FRONTERA; OCHALA et al., 2014; SHADRIN; KHODABUKUS; BURSAC, 2016).

Em resposta à lesão e ao exercício, as CS, que se encontram quiescentes no músculo adulto, se tornam ativas e se proliferam, a fim de contribuir no reparo da lesão. Após a ruptura da lâmina basal em consequência de um miotrauma, as CS migram para a região da lesão, tendo em vista que o evento inicial da degeneração muscular é a necrose das fibras musculares, que conseqüentemente serve como gatilho para o rompimento das proteínas sarcolemiais. No local, participam do processo de regeneração muscular, se dividem por mitose, podendo se fundir para formação de miotubos multinucleados ou fundem-se à célula muscular lesionada, que posteriormente se diferenciam, formando uma nova fibra muscular (DAL PAI SILVA e CARVALHO, 2007; BOFF, 2008; SOUZA et al., 2015; SHADRIN, KHODABUKUS, BURSAC, 2016).

Ainda, no que tange aos processos de plasticidade neuromuscular do músculo esquelético, vale salientar a existência de vias de sinalização específicas para que tais eventos ocorram. Sendo assim, a atrofia e a hipertrofia muscular são eventos característicos que definem a capacidade que o músculo esquelético tem em resposta a variados estímulos. O processo de hipertrofia é regulado por cascatas específicas de sinalização intracelular, responsáveis pela regulação trófica da massa muscular, que são acionadas na prática de exercícios físicos, sejam eles agudos ou crônicos (FERNANDES et al., 2008).

Assim, as vias da treonina/serina quinase (Akt), Calcineurina (Fator nuclear de células T ativadas), MAPks e Miostatina, são algumas das vias responsáveis pela hipertrofia muscular. Assim como também na atrofia, algumas vias são acionadas: Autofagia, Calpaínas dependentes de cálcio, Via lisossomal, Via de sinalização das Caspases e Via de sinalização da Ubiquitina Proteassoma, são as responsáveis por tais eventos (FERNANDES et al., 2008; MACHADO et al., 2009; TEIXEIRA, FILLIPIN, XAVIER, 2012).

Dessa forma, deve-se considerar os fatores adversos advindos da desnervação do sistema muscular e a necessidade decorrente de se criar práticas clínicas que venham a interagir de maneira proficiente na recuperação e na aceleração do processo regenerativo, com intuito de reestabelecer a funcionalidade do paciente. Nessa perspectiva, o exercício físico junto à prática de estratégias terapêuticas se mostra válido.

3.6 Exercício físico e processo de regeneração neuromuscular

Apesar da capacidade de recuperação do sistema nervoso periférico e os avanços até então alcançados pela microcirurgia, a regeneração nervosa continua falha, devido aos caminhos inapropriados de reinervação axonal de nervos mistos (SIQUEIRA, 2007). Além do mais, os axônios lesados podem estar muito distante de seus órgãos-alvo, para restabelecer conexão (Li et al., 2014), tornando a recuperação funcional após lesão nervosa periférica um desafio para a reabilitação.

Quando a lesão ocorre por esmagamento ou compressão e a continuidade do nervo é preservada, a regeneração em si é mais favorável; contudo, fatores como a degeneração Walleriana, que se inicia imediatamente após a lesão, torna-a demasiadamente lenta, conseqüentemente, a maturação das fibras nervosas regeneradas raramente é alcançada (ROBINSON, 2000; VERDÚ et al., 2000; BURNETT et al., 2004).

Diversos fatores limitam o retorno da sensibilidade e da motricidade da região envolvida, como a formação de tecido cicatricial, a perda de rota dos axônios, entre outros (SOBRAL et al., 2008).

Assim, vários estudos experimentais vêm sendo realizados para prevenir a atrofia muscular, no intuito de preservar as condições estruturais e metabólicas do

músculo enquanto a regeneração nervosa se processa. Para isso, tem sido utilizada a eletroestimulação fásica de baixa frequência, e o exercício físico (HERBISON et al., 1980; DENNIS et al., 2003; FERNANDES et al., 2005; SEO et al., 2006). Todavia, a literatura não se mostra unânime quanto ao tipo de intervenção, de tempo e de intensidade exata para quaisquer dessas intervenções (MALYSZ et al., 2011; BERTOLINI et al., 2011; POSSAMAI et al., 2012; CORADINI et al., 2014).

Estudo de Van Meeteren, (1997), alerta que, quando o exercício é iniciado na fase aguda de desnervação, a recuperação sensório-motora e funcional é acelerada. No entanto, adverte quanto à consequência do exercício físico intenso nessa fase, indicando seu efeito deletério, principalmente sobre a função muscular.

Resultados benéficos quanto à utilização do exercício físico algumas horas após a lesão nervosa foram descritos por Seo et al. (2006), utilizando exercício na esteira após 12 horas de esmagamento do nervo isquiático de ratos Sprague-Dawley (30 minutos, 2 vezes ao dia, durante 14 dias). A corrida favoreceu a recuperação sensório-motora e a regeneração axonal além de regular a síntese proteica.

Pagnussat (2009) desenvolveu estudo em ratos com esmagamento do nervo mediano e ulnar. Eles foram submetidos aos protocolos de treinamento de habilidade, que consistia em alcançar alimentos de dentro de uma caixa acrílica e um protocolo de treinamento de repetição, que consistia em caminhar em uma esteira. Evidenciou-se que ambos os protocolos foram suficientes para acelerar a recuperação funcional; porém, o treinamento de repetição produziu um maior grau de regeneração nervosa periférica do que o treinamento de habilidade.

Resultados similares foram obtidos por Teodori et al. (2011), que avaliaram as alterações morfológicas e as características funcionais de ratos *Wistar* submetidos à ciatalgia e ao exercício de natação em períodos distintos. Os pesquisadores concluíram que a natação, independente do período iniciado, fase aguda ou tardia, acelerou o processo de regeneração nervosa, sugerindo, assim, que o exercício físico pode ser iniciado imediatamente após a lesão.

Diferentemente, Sobral et al. (2008), aplicando um protocolo de exercício em esteira, iniciado também em fase imediata e tardia da lesão, sobre a recuperação funcional e histomorfométrica, de nervo isquiático de ratos *Wistar*, constataram que o protocolo de exercício, independente da fase de lesão em que foi iniciado, não

influenciou no brotamento axonal, no grau de maturação das fibras nervosas e nem na recuperação funcional.

Modificações também foram descritas por Gaffuri *et al.* (2011), que aplicaram um protocolo de exercício físico resistido de natação e salto em ratos *Wistar*, submetidos à compressão do nervo isquiático. Os pesquisadores avaliaram a nocicepção pós realização do exercício e concluíram que o exercício físico nos parâmetros aplicados não foi eficaz para reduzir o quadro álgico dos animais. Dados semelhantes foram encontrado por Bertolini *et al.* (2011), aplicando um protocolo de natação durante seis semanas, três vezes por semana, em ratos *Wistar* submetidos à cialgia. Esses, por sua veze, constataram que o exercício físico produziu maior hiperalgesia do que em relação ao grupo controle.

Possamai *et al.* (2012) buscaram avaliar a interferência do exercício em roda motorizada no processo de regeneração nervosa de ratos *Wistar* submetidos à axonotmese e concluíram que embora o exercício físico não tenha interferido na manutenção da viabilidade neuronal nos sítios proximais à lesão, sua continuidade prejudicou a viabilidade dos cotos neurais distais.

Sendo assim, diante das evidências e dos estudos supracitados, o efeito do exercício físico de resistência sobre o processo de recuperação e dereparo nervoso periférico está longe de um consenso.

3.7 Sericicultura

Sabe-se que a sericicultura começou na China em tempos remotos, possivelmente no período neolítico. Um casulo do bicho-da-seda foi descoberto num sítio arqueológico na província de Shanxi, datando de 2600-2300 a.C. Os mais antigos achados referente a restos de seda descobertos datam da Dinastia Shang (sécs. XVI-XIII a.C.). A invenção da seda tem sido tradicionalmente atribuída à Sr^a. Xiling (Sr^a. Xi Ling Shi), a esposa do lendário Imperador Amarelo (*Huangdi*), que supostamente viveu de 1698-1598 a.C. Segundo o filósofo Confúcio, enquanto ela estava bebendo uma xícara de chá sob uma amoreira, um casulo de seda caiu-lhe na xícara. Ela observou trivialmente que o fio de seda começou a desenrolar-se no chá quente. Ao verificar tal fato, desenrolou os fios de seda e usou-os para fabricar tecidos (PAPAVERO; PUJOL LUZ, 2011).

Da China, o inseto foi introduzido no Japão, no Turquestão e na Grécia. No ano de 1740, o bicho-da-seda se expandiu pela Europa, especificamente, Espanha, França, Itália e Áustria. Já na metade do século XVIII, ocorreu a introdução da sericultura no território brasileiro, no Estado do Rio de Janeiro, e, em 1922, na cidade de Campinas-SP, foi criada a primeira Indústria de Seda Nacional S.A. A partir da década de 30, a sericultura tornou-se uma importante atividade para a agroindústria brasileira e, atualmente, o Estado do Paraná é o maior produtor nacional de casulos verdes de bicho-da-seda (BUSCH, 2010). No Brasil, a sericultura é uma importante atividade agroindustrial, contribuindo substancialmente para a economia rural.

Segundo Busch (2010), o país é o 6º produtor mundial de casulos verdes e fios de seda. A atividade desenvolve-se, sobretudo, nas pequenas propriedades rurais, nas quais predomina o trabalho familiar, representando uma alternativa importante para a melhoria da renda dessas propriedades e contribuindo para a diminuição do êxodo rural. Assim, pode-se considerar que a sericultura contribui de forma direta para o desenvolvimento sustentável do país, tendo em vista seu relevante aspecto social, devido também ao baixo impacto ambiental que a atividade exerce.

Só em 2009, o Brasil exportou, entre seda e produtos da seda, 977 toneladas, o equivalente a R\$ 26,3 milhões para o país, sendo obtido o preço médio esse ano de US\$ 26,94/kg (BUSCH, 2010).

Atualmente, a sericina possui um valor comercial substancial, sendo utilizada em uma gama variada de setores, com diversos objetivos, desde alternativas medicinais, cosméticas, alimentícias, até revestimento de fibras artificiais e naturais (SAROVART et al., 2003; ARANWIT et al., 2011).

Conseqüentemente, o aumento do segmento da sericultura alavancou concomitantemente o interesse da área científica. Dentre as várias pesquisas já realizadas e as aplicações farmacológicas comprovadas acerca das alternativas biocompatíveis encontradas, o quesito regeneração nervosa a partir de condutas biodisponíveis se mostra válida (YANG et al., 2007; YANG et al., 2011; WEI et al., 2011; DINIS et al., 2014; DIAS et al., 2015; WANG et al., 2015).

3.7.1 Estrutura do casulo da seda *Bombyx mori*

A conformação estrutural da concha de casulo da seda *Bombyx mori* se dá a partir de polímeros de proteína, sendo que a sericina envolve a fibra fibroína com sucessivas camadas adesivas (Figura 11), assegurando, assim, a coesão do casulo por colagem dos fios de seda em conjunto. Há uma terceira proteína, a P25, que também auxilia na manutenção da continuidade do fio; porém, em menor concentração. A fibroína é responsável pela parte predominante da composição, cerca de 70% do total de peso da concha de casulo, já os componentes de sericina contribuem apenas com 20% a 30% (PADAMWAR et al., 2005; ARANWIT et al., 2011). A constituição desses casulos se difere em seus componentes e estruturas de acordo com os insetos que o produzem (SUNHE et al., 2010).

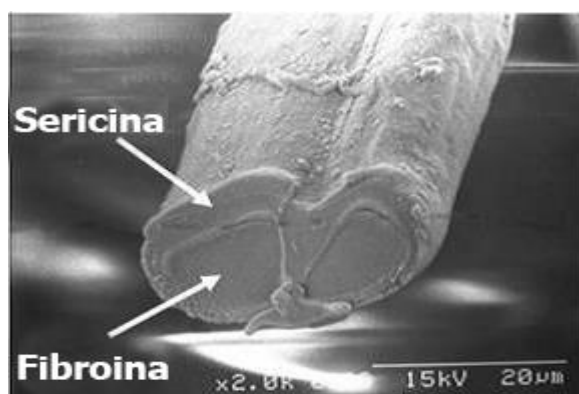


Figura 11 – Imagem da secção transversal de um casulo com as fibras de revestimento sendo representadas, sericina e fibroína (SCHEAFER; UBINGER, 2013).

3.7.2 Sericina, estrutura e métodos de extração

A sericina é uma família de peptídeos com peso molecular variando entre 24 a 400 kDa (dalton), dependendo do método de extração, da temperatura, do pH e do tempo de processamento. Ela pode oferecer diferentes composições de aminoácidos, sendo que 70% do conteúdo total de aminoácidos da sericina são aminoácidos polares, especialmente serina e ácido aspártico (ARANWIT et al., 2011).

No casulo, o fio de sericina forma três frações diferentes de fora para dentro cobrindo a fibroína, essas camadas são denominadas de camada I, II e III ou A, B e C, respectivamente (PADAMWAR, 2004; BARAJAS et al., 2016) e delas pode-se extrair até quatro componentes (ARANWIT et al., 2011).

No que diz respeito à sua solubilidade, alguns autores a classificam em duas classes: α -sericina e β -sericina. A primeira está localizada na camada exterior e tem

alta solubilidade em água quente. A segunda é na camada interna e possui baixa solubilidade quando comparada à primeira. Essa diferença entre as subunidades pode ser explicada pela presença de uma quantidade menor de átomos de carbono e hidrogênio, e uma maior presença de nitrogênio e oxigênio na β -sericina (PADAMWAR, 2004; RAJPUT; KUMAR, 2015; BARAJAS et al., 2016).

Em pó, possui uma estrutura amorfa, que na presença de água se transforma numa estrutura- β ; essa, por sua vez, varia dependendo da maneira que a sericina é preparada, podendo permanecer num estado parcialmente desdobrado com 35% de folhas- β e 63% de enrolamento aleatório, não contendo α -hélice (PADAMWAR, 2004; ARANWIT et al., 2011; RAJPUT; KUMAR, 2015).

Existem vários métodos para extração da sericina. Um deles é a degomagem de casulos, que pode ser realizada pela extração em auto-clavagem com variação de tempo entre quinze minutos e três horas, obtendo também certa variação no peso molecular (PADAMWAR, 2004; BARAJAS et al., 2016). Outro método é a extração por ácido e calor, dando à sericina um peso molecular de 35 a 150 kDa, enquanto a extração por solução alcalina concede a ela um peso molecular de 15 a 75 kDa e a extração usando uréia um peso molecular variando entre 10 a >225 kDa (ARANWIT et al., 2011).

Quando a sericina é extraída a partir do casulo *Bombyx Mory* em autoclave, com temperatura de 105°C, durante 30', obtém-se uma sericina com boa propriedade de gelificação e rendimento. Uma nova elevação na temperatura aumenta o rendimento; no entanto, perde-se as propriedades de gelificação (RAJPUT; KUMAR, 2015). É mister ressaltar que tais processos não são normalmente aplicados na indústria da seda, pois o tratamento é muito longo e provoca danos significativos à fibroína, mesmo o processo resultando em nenhuma impureza (ARANWIT et al., 2011).

A composição de aminoácidos da sericina (Tabela 1) lhe concede um caráter hidrofílico (KUNDU et al., 2008; ARANWIT et al., 2011), viabilizando, assim, o processo de degomagem, devido à polaridade dos aminoácidos, o que possibilita a remoção quando aquecidos em água, já que apresentam características hidrossolúveis (PADAMWAR, 2004; ZHANG et al., 2006).

Tabela 1 – 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)

3.7.3 Sericina e seu potencial uso

A sericina é uma proteína natural e bem conhecida atualmente, principalmente por possuir um valor comercial substancial; tem sido utilizada em diversos setores da sociedade (SAROVART et al., 2003; ARANWIT et al., 2011).

Essa proteína tem excelentes propriedades antioxidantes e antibacterianas, resistência à ultravioleta e resistência à umidade, sendo utilizada em diversas aplicações como cosméticos, membranas, suportes para enzimas imobilizadas, suplemento alimentar, matéria-prima para medicamentos e fibras funcionais (KONGDEE et al., 2004; ARANWIT et al., 2011).

Por ter efeitos farmacológicos comprovados, a sericina é constantemente estudada no meio científico, incluindo efeitos sobre regeneração de tecido cartilaginoso (DINESCU et al., 2013), diminuição do colesterol plasmático (LIMPEANCHOB et al., 2010) e redução da apoptose neuronal no hipocampo (ZHIHONG et al., 2012). Quando utilizada na forma de peptídeos, associada ao exercício, melhora o desempenho aeróbico e a oxidação de gordura em repouso (KIM et al., 2013; KIM et al., 2014), além de proteger contra lesão nervosa induzida por diabetes no nervo isquiático (SONG et al., 2013).

Embora o uso da sericina no tratamento da regeneração nervosa periférica ainda se mostre pouco estudada, o uso de proteínas como conduta biocompatível no quesito aceleração do reparo nervoso sem dúvida alguma se apresenta como uma das mais relevantes e válidas por parte dos pesquisadores (YANG et al., 2007;

ZHANG et al., 2010; YANG et al., 2011; WEI et al., 2011; DINIS et al., 2014, DIAS et al., 2015).

Segundo Wang et al. (2015), a sericina na forma de hidrogel reticulado sericina-genipina (GSH) se mostrou neurotrópica e neuroprotetora, promovendo a extensão e a ramificação do axônio, bem como preveniu a morte celular de neurônio primário por hipóxia, junto à genipina, um agente reticulador biocompatível, que serve como potencial veículo de entrega, em um modelo de acidente vascular cerebral *in vitro*. Isso demonstra o potencial uso da sericina como importante matéria-prima para o uso em diversas disfunções orgânicas.

Ademais, a sericultura apresenta-se como meio de subsistência econômica para muitos trabalhadores no campo, sendo desenvolvida, sobretudo, em pequenas propriedades rurais, com predomínio do trabalho familiar, demonstrando ser uma alternativa importante para melhoria da renda dessas propriedades e, cooperando de maneira a diminuir o êxodo rural. Além disso, a sericultura contribui para o desenvolvimento sustentável do país, devido ao seu relevante aspecto social e baixo impacto ambiental (BRANCALHÃO, 2002; FERNANDEZ et al., 2005).

Sendo assim, convém ressaltar que existe a necessidade de estudos e de pesquisas contínuas nessa área, diante do amplo aspecto biossocial que a pesquisa abrange, além dos vários questionamentos e interrogações quanto ao uso da sericina e ao seu potencial efeito neuroprotetor, como conduta biocompatível na regeneração neuromuscular.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMS, P. H. **Atlas descritivo do corpo humano**. 2ed. São Paulo, Ridell, 2011.

ACHUTTI, A.; AZAMBUJA, M. I. R. Doenças crônicas não-transmissíveis no Brasil: repercussões do modelo de atenção à saúde sobre a seguridade social, **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 9, n. 4, p. 833-840, 2004.

ANDONIAN, M.H.; FAHIM, M.A. Effects of endurance exercise on the morphology of mouse neuromuscular junctions during ageing. **Journal of Neurocytology**, v.16, p. 589-599, 1987.

ANDONIAN, M.H.; FAHIM, M.A. Endurance exercise alters the morphology of fast- and slow-twitch rat neuromuscular junctions. **International Journal of Sports Medicine**, v. 9, p.218-223, 1988.

ARAMWIT, P. SIRITIENTONG, T. SRICHANA, T. Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products. **Waste Management & Research**, v. 30, n. 3, p. 217-224, 2011.

BARAJAS-GAMBOA, J. A; ALVAREZ-LÓPEZ, C.; RESTREPO O.; ADRIANA S. G.; ANGÉLICA M. SERICIN applications: a globular silk protein. **Ingeniería y Competitividad**, v.18, n.1, p. 93-103, 2016.

BARKER, D.; IP, M.C. Sprouting and degeneration of mammalian motor axons. Proceedings of the Royal Society of London. **Series B Biological Sciences**. v. 163, p. 538-554, 1965.

BERTOLINI, G. R. F.; NASCIMENTO, C. M. D.; ARTIFON, E. L.; CUNHA, D. M.; MEIRELES, A. Treinamento com natação sobre a avaliação funcional da nocicepção ciática em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n.3, p. 249-259, 2011.

BICUDO, J. E. Atividade Física e Plasticidade da Musculatura Esquelética. **Revista da Biologia**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2013.

BODINE, S. C. BAEHR, L. M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 6, p. 469-484, 2014.

BOFF, S. R. Artigo de Revisão: The muscle fiber and the factors that interfere with its phenotype. **Acta Fisiatrica**, v. 15, n. 2, p.111-116, 2008.

BOSSE, F.; KÜRY, P.; MÜLLER, H. W. Gene expression profiling and molecular in peripheral nerve regeneration. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v.19, n.1-2, p. 5-18, 2001.

BRANCALHÃO, R.M. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 24 n. 1, p. 54-58, 2002.

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.

BURNETT MG, ZAGER EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: **A brief review. Neurosurgical Focus**. v. 16, n.5, p. 1-7, 2004.

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: 25 de jun. 2015.

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

CARLSON, B. M. The biology of long-term denervated skeletal muscle. **European Journal Translation Myology – Basic Applied Myology**, v. 24, n. 1, p. 5-11, 2014.

CARMIGNOTO, G.; FINESSO, M. SILIPRANDI R.; GORIO, A. Muscle reinnervation – I. Restoration of transmitter release mechanisms. **Neuroscience**, v. 3, p. 393-401, 1983.

CEYLAN, O.; SEYFETTINOGLU, F.; DULGEROGLU, A. M.; AVCI, A.; BAYRAM, B.; BORA, O. A. Histomorphological comparison of immobilization and desneration atrofies. **Acta Orthopaedica et Traumatológica Túrca**, v. 48, n. 3, p. 320-325, 2014.

CIABATTARI, O.; DAL PAI, A.; DAL PAI, V. Efeito da natação associado a diferentes dietas sobre o músculo tibial anterior do rato: Estudo morfológico e histoquímico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 2, p. 121-125, 2005.

CHACHA, J. J.; SOTTO, M. N; LOURENÇO, S.; MELNIKOV, P. Peripheral nervous system and grounds for the neural insult in leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n.5, p. 495-500, 2009.

COLLI B.O. Aspectos gerais das lesões traumáticas agudas nos nervos periféricos. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**, v.12, p.171-200, 1993.

CORADINI, J. G., KAKIHATA, C. M. M., KUNZ, R. I., ERRERO T. KAMADA., BONFLEUR, M. L., BERTOLINI, G. R. F. Avaliação da força de preensão em ratos *Wistar*, normais e obesos, submetidos à natação com sobrecarga após compressão do nervo mediano. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 1, p. 43-47, 2014.

CSERNOCH, L., JACQUEMOND, V. Phosphoinositides in Ca²⁺ signaling and excitation–contraction coupling in skeletal muscle: an old player and newcomers. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 1, n. 2 p. 1-9, 2015.

DAL, M. S. P.; CARVALHO, F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n.1, p. 21-31, 2007.

DENNIS RG, DOW DE, FAULKNER JA. An implantable device for stimulation of denervated muscles in rats. **Medical Engineering e Physics**, v. 25, n.3, p. 239-53, 2003.

DESAULNIERS, P.; LAVOIE, P.A.; GARDINER, P.F. Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at neuromuscular junctions of adult ratskeletal muscle. **Neuroreport**, v. 9, p. 3549-3552, 1998.

DESCHENES MR, MARESH CM, CRIVELLO JF, ARMSTRONG LE, KRAEMER WJ, COVAULT J. The effects of exercise training of different intensiteson neuromuscular junction morphology. **Journal of Neurocytology**, v. 22, p. 603-615,1993.

DESCHENES, MR. TENNY, KA. KRAIMER, WJ. Exercise training of moderate intensity does not abate the effects of denervation on muscle morphology. **International Journal of sports Medicine**, v.18, n.6, p. 426-30, 1997.

DESCHENES, MICHAEL R, DANIEL A. JUDELSON, WILLIAM J. KRAEMER, VICTORIA J. MESKAITIS, JEFF S. VOLEK, BRADLEY C. NINDL, FRED S. HARMAN, and DANIEL R. DEEVER. Effects of Resistance Training on Neuromuscular Junction Morphology. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 10, p. 1576-81, 2000.

DESCHENES, M. R.; WILSON, M. H. Age-Related Differences in Synaptic Plasticity following Muscle Unloading. **Journal of Neurobiology**, v. 57, n. 3, p. 246-256, 2003.

DEUMENS R.; BOZKURT, A.; M. MEEK; M. MARCUS; E. JOOSTEN; J. WEIS; G. BROOK. "Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap" Progress in **Neurobiology**. v. 92, p. 245-276, 2010.

DIAS, F. J., ISSA, JOAO P. M., COUTINHO-NETTO, JOAQUIM F, VALÉRIA P.S. S, LUIZ G, IYOMASA, MAMIE M., PAPA, PAULA C. WATANABE, II-SEI. 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. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 349, 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.1, p. 1-11, 2013.

DINIS T. M, VIDAL, G, JOSE, R. R., VIGNERON, PASCALE, BRESSON, DAMIEN, F, VINCENT M, FRÉDÉRIC K, DAVID L., EGLES, C. Complementary Effects of Two Growth Factors in Multifunctionalized Silk Nanofibers for Nerve Reconstruction. **Journal PLOS ONE**. www.plosone.org. v. 9, p. 1-9, 2014.

DISTAD, B. J.; WEISS, M. D. Clinical and electrodiagnostic features of sciatic neuropathies, **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America, Philadelphia**, v. 24, n. 1, p. 107–120, 2013.

DOURADO, E. et al. Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, Camaragibe, v. 3, n. 2, p. 49-54, 2003.

DURAKU, L. S.; HOSSAINI, M.; HOENDERVANGERS, S.; FALKE, L. L.; KAMBIZ, S.; MUDERA, V. C.; HOLSTEGE, J.C.; WALBEEHM, E. T.; RUIGROK, T. J.H. Spatiotemporal dynamics of re-innervation and hyperinnervation patterns by uninjured CGRP fibers in the rat foot sole epidermis after nerve injury. **Molecular Pain**, v. 8, n. 1, p. 61, 2012.

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

ESTRELLA, N. L.; FRANCISCO J. N. Transcriptional networks regulating the costamere, sarcomere, and other cytoskeletal structures in striated muscle. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 71, n. 9, p. 1641-56, 2014.

FAHIM, M.A.; ROBBINS, N. Remodeling of the neuromuscular junction after subtotal disuse. **Brain Research**, v.383, p. 353-356, 1986.

FAHIM, M.A. Endurance exercise modulates neuromuscular junction of C57BL/NNia aging mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, p. 59-66, 1997.

FERNANDES KCBG, POLACOW MLO, GUIRRO RRJ, Campos GER, Somazz MC, Pinto VF et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 9, n.2, p. 235-41, 2005.

FERNANDEZ, M. A.; CIFERRI, R. R.; PATUSSI, E. V.; PEREIRA, M. F. FELIPES, J. A utilização da Biotecnologia na Sericultura Brasileira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, n. 35, p. 52-57, 2005.

FERNANDES, T, URSULA P. R. S, ALVES R. A., CARMO E. C, BARROS J.G., OLIVEIRA, E. M. Determinantes Moleculares da Hipertrofia do Músculo Esquelético Mediados pelo Treinamento Físico: estudo de vias de sinalização. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v.7, n. 1, p. 169-188, 2008.

FERRARO, E, MOLINARI F, BERGHELLA L. Molecular control of neuromuscular junction development. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 3, n. 1, p. 13-23, 2012.

FERREIRA, A. T. Fisiologia da Contração Muscular, Physiology of muscular contraction. **Revista Neurociências**, v. 13, n.3, p. 60-62, 2005.

FONSECA, N. M.; FERREIRA, X. F.; 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.

FULLER, P. M.; BALDWIN, K. M.; FULLER, C. A. Parallel and divergent adaptations of rat soleus and plantaris to chronic exercise and hypergravity. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 290, n. 2, p. 442-448, 2006.

FRISCHKNECHT, R, BELVERSTONE, D. VRBOVÁ, G. The response of adult and developing rat plantaris muscle to overload. **European J Physiol**, v. 431, p. 204-2011, 1995.

FRONTERA, WALTER R.; OCHALA, JULIEN. Skeletal muscle: a brief review of structure and function, **Calcified tissue international**, v. 96, n. 3, p. 183-195, 2014.

GAFFURI, J.; MEIRELES, A.; ROCHA, B. P.; ROSA, C. T.; ARTIFON, E. L.; SILVA, L. I.; MOREIRA, N. B.; BERTOLINI, G. R. F. Avaliação do exercício físico como fator de analgesia em um modelo experimental de cialgia, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 2, p. 115-118, 2011.

GATTUSO, J.M.; DAVIS, A.H.; GLASBY, M.A, GSCHMEISSNER SE, HUANG CL. Peripheral nerve repair using muscle autografts. Recovery of neuromuscular transmission after peripheral nerve repair with muscle autografts in the non-human primate. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 70, p. 524-529, 1988.

GEUNA S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. **J Neurosci Methods**. v. 243, n. 1, p.39–46, 2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Tradução da 11ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

HALL, ZW. SANES, JR. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell Press**, v. 72, p. 99-121, 1993.

HERBISON GJ, JAWEED MM, DITUNNO JF. Histochemical fiber type alterations secondary to exercise training of reinnervating adult rat muscle. **Archives of Physical Medicine Rehabilitation**, v. 61, n. 6, p. 255-57, 1980.

HUGHES, BW.; KUSNER, LL.; KAMINSKI, HJ. Molecular architecture of the neuromuscular junction. **Muscle & Nerve**, v.33, n. 4, p. 445-461, 2006.

IDE C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**, v. 25, p.101-21, 1996.

JUNIOR, R. G. M.; MAGALHÃES; R. M.; GUTIERREZ, V. C.; BUENO, C. R. S.; SIMIONATO, L. H.; BORTOLUCI, C. H. F. Efeito da associação da laserterapia com a natação no reparo morfológico do nervo isquiático e na recuperação funcional de ratos submetidos à axonotmese. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 23, n.1, p. 12-20, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KÄÄRIÄINEN, M.; KAUKANEN, S. Skeletal muscle injury and repair: The effect of disuse and denervation on muscle and clinical relevance in pedicled and free muscle flaps. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 28, n.9, p. 581-587, 2012.

KALAMIDA D, POULAS K, AVRAMOPOULOU V, FOSTIERI E, LAGOUMINTZIS G, LAZARIDIS K, SIDERI A, ZOURIDAKIS M, TZARTOS SJ. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. **The FEBES Journal**, v. 274, n. 15, p. 3799-845, 2007.

KAWABUCHI, M.; TAN, H.; WANG, S. Age affects reciprocal cellular interactions in neuromuscular synapses following peripheral nerve injury. **AGEING RESEARCH**, v. 10, n.1, p. 43-53, 2011.

KENDALL, F. P. et al. **Músculos: provas e funções**. 5. ed. São Paulo, SP: Manole, 2007.

KERN, H.; HOFER, C.; MODLIN, M.; FORSTNER, C.; RASCHKA-HOGLER, D.; MAYR, W.; STOHR, W. Denervated muscle in humans: limitations and problems of currently used functional electrical stimulation training protocols. **Artificial Organs**, v. 26, n. 3, p. 216-218, 2002.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KIM, J.; HWANG H.; YUN, H.Y.; KIM, B.; LEE, CH.; SUH, H.; LIM, KIWON. Silk Peptide intake increases fat oxidation at rest in exercised mice. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 59, n. 3, p. 250-5, 2013.

KIM, J.; HWANG H.; PARK, J.; YUN, H.Y.; SUH H.; LIM KIWON. Silk peptide treatment can improve the exercise performance of mice. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n.1, p. 35, 2014.

KONGDEE, A.; BECHTOLD, T.; TEUFEL, L. Modification of Cellulose Fiber with Silk Sericin. **J. App. Pol. Scie.**, v. 96, p. 1421-1428, 2004.

KUJAWA, M.; BARAN, W.; JANKOWSKA-STEIFER, E. Quantitative ultrastructural changes in satellite cells of rats immobilized after soleus muscle denervation. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 78, n. 1, p. 78-85. 2005.

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.

LAWRENCE, R.; ROBINSON, M. D. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle & Nerve**, New York, v. 23, n. 6, p. 863–873, 2000.

LEHRER, G. M. & ORNSTEIN, L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. **Biophys. Biochem. Cytol.**, v.6, n. 3, p.399-419, 1959.

LI, R.; LIU, Z.; PAN, Y.; CHEN, L.; ZHANG, Z.; LU, L. Peripheral nerve injuries treatment: a systematic review. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 3, p. 449-454, 2014.

LIEBER, RL. Skeletal muscle structure, function and plasticity: **the physiological basis of rehabilitation**. 2 ed. San Diego: Lippincott Wilians e Wikins, p. 369, 2002.

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.

MACHADO, J.; KRINSKI, K.; ELSANGEDY, H. M.; CIESLAK, F.; LOPES, G.; RAQUEL, A.; GOMES, S. Intracellular pathways signaling in muscle atrophy and resistance training. **Fisioter. Mov.**, v. 22, n.3, p. 383-393, 2009.

MAHADEVA, B.; PHILIPS, L.H.; JUEL, V.C. Autoimmune disorders of neuromuscular transmission. **Seminars in Neurology**, v.28, n. 2, p. 212-27, 2008.

MALYSZ, T.; ILHA, J.; SEVERO N. P.; FACCIONI-HEUSER, M. C.; DE ANGELIS, K.; D'AGORD S., B.; ACHAVAL, M. Exercise training improves the soleus muscle morphology in experimental diabetic nerve regeneration. **Muscle & nerve**, v. 44, n. 4, p. 571-582, 2011.

MARQUES, MJ.; CONCHELLO, JA.; LICHTMAN, J. W. From plaque to pretzel: Fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. **Journal of Neuroscience**. v. 20, p. 3663-3675, 2000.

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 Neuropsiquiatria**, v. 71, n. 10, p. 811-814, 2013.

MATSUDA, Y.; OKI, S.; KITAOKA, K.; NAGANO, Y.; NOJIMA, M. & DESAKI, J. Scanning electron microscopic study of denervated and reinnervated neuromuscular junction. **Muscle Nerve**, v.11, p. 1266-71, 1988.

MAZZER, P. Y. C. N., CLÁUDIO H. B., NILTON M., VALÉRIA P. S. F. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 220-225, 2006.

MILJKOVIC, N.; LIM, J-Y.; MILJKOVIC, I.; FRONTERA, W. R. Aging of Skeletal Muscle Fibers. **Annals of Rehabilitation Medicine**, v. 39, n. 2, p. 155, 2015.

MINAMOTO, V. B. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão
Classification and adaptations of muscle fibers : a review. **FISIOTERAPIA E PESQUISA**, v. 12, n. 3, p. 50-55, 2005.

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

MONTE-RASO, V. V. et al. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático em ratos: análise funcional da marcha. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 10, n. 1, p. 113-119, 2006.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia Orientada para a clínica**. 5ª ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2007.

MOURA, A. A. G.; CARVALHO, E. F.; SILVA, N. J. Repercussão das doenças crônicas não-transmissíveis na concessão de benefícios pela previdência social, **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 6, p. 1661-1672, 2007.

MUSCATELLO, U.; MARGRETH, A.; ALOISI, M. On the differential response of sarcoplasm and myoplasm to denervation in frog muscle. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 1, p. 1-24, 1965.

OGATA, T. Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 51, n. 1, p. 385-424, 1988.

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

NETTER, Frank H.. **Atlas de Anatomia Humana**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

NUNES, W. M. S.; MELLO, M. A. R. Glucose metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 4, p. 541-548, 2005.

NUNES, W. M. S.; MELLO, M. A. R. Metabolismo Glicídico em Ratos Submetidos a Desnervação do Músculo Esquelético e ao Exercício de Natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 1, p. 42-45, 2009.

PAGNUSSAT A, **Aspectos motores e neurais de ratos submetidos a lesão do sistema nervoso central e periférico e tratamento de reabilitação**, 133 f. (Doutorado em ciências biológicas/neurociência) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2009.

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.

PADAMWAR, M. N.; PAWAR, A. P. Silk sericin and its applications: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, n.4, p. 323-329, 2004.

PIOVESAN, R.F., MARTINS, M.D., FERNANDES, K P. S., BUSSADORI, S K., SELISTRE A., HELOISA S. M. F., RAQUEL A. Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. **Fisioterapia em Movimento**, v. 22, n. 2, p. 211-220, 2009.

POSSAMAI, F. P., DANIELA R. S., TIAGO S. A., EDISON S. Repercussões morfológicas e funcionais do exercício sobre a regeneração nervosa periférica. **Fisioterapia e Movimento**, v. 25, n. 3, p. 617-627, 2012.

PRZYBYLA, B. et al. Aging alters macrophage properties in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. **Exp. Gerontol.**, v. 41, n. 3, p. 320-327, 2005.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A. S.; McNAMARA, J. O.; WHITE, L. E. **Neurociências**. 4ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

RAJPUT, S. K.; KUMAR S. M. Sericin – A Unique Biomaterial. **IOSR Journal of Polymer and Textile Engineering**, v. 2, n.3, p. 2348-181, 2015.

RANDOLPH, M. E.; PAVLATH, G. K. A muscle stem cell for every muscle: variability of satellite cell biology among different muscle groups. **Frontiers in aging neuroscience**. v. 7, n. 10, p.190, 2015.

REBBECK, R. T.; KARUNASEKARA, Y.; BOARD, P. G.; BEARD, N. A.; CASAROTTO, M. G.; DULHUNTY, A. F. The International Journal of Biochemistry Skeletal muscle excitation – contraction coupling : Who are the dancing partners ?. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 48, n. 1, p. 28-38, 2014.

RIBCHESTER, RR. Mammalian neuromuscular junctions: modern tools to monitor synaptic form and function. **Current Opinion Pharmacology**. v. 9, n. 3, p. 297-305, 2009.

RICARD F. Estadísticas comparativas en los tratamientos de lumbociáticas por hernia discal. **Fisioterapia**. v.22, p. 20-30, 2000.

ROBINSON LR. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle & Nerve**. v. 23 n. 6, p. 863-73, 2000.

ROY, R. R.; KIM, J. A.; MONTI, R. J.; ZHONG, H.; EDGERTON, V. R. Architectural and histochemical properties of cat hip 'cuff' muscles. **Acta anatomica (Basel)**, v.159, n. 2-3, p.136-146, 1997.

RUFF, RL. Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. **New York Academy of Sciences**. v. 998, p. 1-10, 2003.

RUSSO, T. L.; FRANÇA, C. N.; CASTRO, C. E. S.; SALVINI, T. F. Alterações na cronaxia, da reobase e da acomodação no músculo esquelético desnervado submetido à eletroestimulação. **Revista brasileira de Fisioterapia**. v. 8, n. 2, p. 169-175, 2004.

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.

SANES, JR, LICHTMAN, JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annual Review of Neuroscience**. v. 22, p. 389-442, 1999.

SANES, JR. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 15, p. 12601-12604, 2003.

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

SEO, T. B.; HAN, I. S. YOON, J. H.; HONG, K. E.; YOON, S. J.; NAMGUNG, U. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 38, n. 7, p. 1267-1276, 2006.

SEDDON, H. J. Three types of nerve injury. **Brain A Journal of neurology**, v. 66, n. 4, p. 237-288, 1943.

SILVA M. D. P.; CARVALHO, F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 21-31, 2007.

SILVA K. C.; CAMARGO E. A. Mecanismos Envolvidos Na Regeneração De Lesões Nervosas Periféricas. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 1, p. 93-98, 2010.

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

SPINA A. A. The plantaris muscle: anatomy, injury, imaging, and treatment. **J Can Chiropr Assoc.** v. 51, n. 3, p. 158-165, 2007.

SOBRAL, L.L. OLIVEIRA, L.S.; TAKEDA, S. Y. M.; SOMAZZ, M. C.; MONTEBELO, M. I. L.; TEODORI, R. M. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise histomorfométrica e funcional. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n.4, p. 311-316, 2008.

SONG, C., ZHENJUN Y, MEIRONG Z, ZHIHONG C. Sericin protects against diabetes-induced injuries in sciatic nerve and related nerve cells. **Neural Regeneration Research.** v. 8, p. 506-513, 2013.

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.

SOUZA, D. K.; OLIVEIRA, J. R.; RODRIGUES, H.; COTA, N. B.; CARVALHO, M. M.; PRESTES, J.; DURIGAN, J. L. Q.; PEREIRA, E. C. L. Regulação e ativação das células satélites durante a regeneração muscular. **Revista Brasileira de Ciências e Movimento**, v. 23, n. 3, p. 170-180, 2015.

SUNDERLAND S. **Nerves and nerve injuries**, 2nd edition. New York: Churchill Livingstone, p. 133-8, 1978.

SUNHEE S., SEONGHO Y., DONGSUN P., JIYOUNG O.H., HYOMIN K., SUNGHYUN K., SEONG S. J., WOO-T. L., JEONG-Y. L., KYUNG-C. C., KI Y. K., SEUNG U. K., JONG-C. K. AND YUN-B. K. Silk Amino Acids Improve Physical Stamina and Male Reproductive Function of Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n.2, p. 273-278, 2010.

SCHEAFER R.; UBINGER M. Nerve guidance conduits developed from silk fibroin for peripheral nerve regeneration. Session B2 3170, University of Pittsburgh Swanson **School of Engineering**, p. 1-12, 2013.

SCHMALBRUCH, H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. **Anatomical Record**, v. 215, n. 1, p. 71-81, 1986.

SHADRIN, I. Y.; KHODABUKUS, A.; BURSAC, N. Striated muscle function, regeneration, and repair, **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-28, 2016.

STANDRING, S. **Gray's Anatomy: the anatomical basis of clinical practice**. 40^a ed. London: Churchill Livingstone, 2008.

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 Anaesthesia**, v. 99, n. 4, p. 461–473, 2007.

TEIXEIRA, V. O. N.; FILIPPIN, L. I.; XAVIER, R. M. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 252-259, 2012.

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.

TINTIGNAC, L. A B.; HANS-R.; RÜEGG, M. A. Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. **Physiological reviews**, v. 95, n. 3, p. 809-52, 2015.

TOPP, K. S.; BOYD, B. S.; Peripheral nerve: From the microscopic functional unit of the axon to the biomechanically loaded macroscopic structure. **Journal of Hand Therapy**, v. 25, n.2, p. 142-152, 2012.

TORREJAIS, M. M.; SOARES, J. C.; MATHEUS, S. M. M.; MELLO, J. M.; FRANCIÁ-FARJE, L. A D.; VICENTE, E. J. D. Morphometric and morphological analysis of neuromuscular junction alterations in the denervated rat diaphragm. **Int. j. morphol**, v. 27, n.4, p.1235-1242, 2009.

TORTORA, J. G.; NIELSEN T. M. **Princípios da Anatomia Humana**, 12^o edição, Editora Guanabara Koogan Ltda, copyright, 2013.

VAN MEETEREN, N. L. U.; BRANKKEE, J. H.; HAMERS, F. P. T.; HELDERS, P. J. M.; GISPEN, W. H. Exercise training improves functional recovery and motor nerve

conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 78, n. 1, p. 70–77, 1997.

VERDÚ E, CEBALLOS D, VILCHES JJ, NAVARRO X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 5, n. 4, p. 191-208, 2000.

WAERHAUG, O.; DAHL, H. A; KARDEL, K. Different effects of physical training on morphology of motor nerve terminals in rat extensor digitorum longus and soleus muscle. **Anatomy and Embryology**, v. 186, p. 125-128, 1992.

WALSH, FS.; HOBBS, C.; WELLS, DJ.; SLATER, CR.; FAZELI, S. Ectopic expression of NCAM in skeletal muscle of transgenic results in terminal sprouting at the neuromuscular junction and altered structure but not function. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 244-261, 2000.

WANG, Z.; WANG, J.; JIN, Y.; LUO, Z.; YANG, W.; XIE, H.; HUANG, K.; WANG, L. A Neuroprotective Sericin Hydrogel As an Effective Neuronal Cell Carrier for the Repair of Ischemic Stroke. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v.7, n.44, p.24629-24640, 2015.

WEI, YUJUN, GONG, KAI, ZHENG, ZHENGHUAN, WANG, AIJUN, AO, QIANG, GONG, YANDAO, ZHANG, XIUFANG. Chitosan/silk fibroin-based tissue-engineered graft seeded with adipose-derived stem cells enhances nerve regeneration in a rat model. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v. 22, p. 1947-1964, 2011.

WOITIEZ, R D, BAAN, G C, HUIJING, P A, ROZENDAL, R H. Functional Characteristics of the Calf Muscles of the Rat. **Journal of Morphology**, v. 184, p. 375-387, 1985.

YAN Z, OKUTSU M, AKHTAR YN, LIRA VA, LEE CS, GEORGIUO DK, et al. Regulation of exercise-induced fiber type transformation , mitochondrial biogenesis , and angiogenesis in skeletal muscle. **Am Physiol Soc**, v.110, n.1, p. 264–74, 2011.

YANG Y, YUAN X, DING F, YAO D, GU Y, LIU J, and GU X. Repair of rat sciatic nerve gap by a silk Fibroin-Based Scaffold Added With Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering**, v. 17, p. 2231-2244, 2011.

YANG, Y, DING, FEI, WU, JIAN, HU, WEN, LIU, WEI, LIU, JIE, GU, X. Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. **Journal Biomaterials**. v. 28, p. 5526-5536, 2007.

ZHIHONG, C., YAQIANG S, CHENGJUN D, ZHIJUN S, ZHEJUN X, JINGFENG Sericin. can reduce hippocampal neuronal apoptosis by activating the Akt signal transduction pathway in a rat model of diabetes mellitus. **Neural Regeneration Research**. v.7, p. 197-201, 2012.

ZHANG, FENG, LIU, RONG, ZUO, BAO Q., QIN, JIAN Z. Electrospun silk fibroin nanofiber tubes for peripheral nerve regeneration. 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical **Engineering**, p. 8-11, 2010.

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. **Jornal of Controlled Release**, v.115, n. 1, p. 307-315, 2006.

ZHAORIGETU S.; YANAKA N.; SASAKI M.; WATANABE H. and NORIHISAKATO. Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF-a, **Oncology Reports**, v. 10, p. 537-543, 2003.

5 ARTIGO CIENTÍFICO:

SERICINA E NATAÇÃO SOBRE PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS DO MÚSCULO PLANTAR DESNERVADO DE RATOS WISTAR

Que será submetido para a revista Einstein, Instituto Israelista de Ensino e Pesquisa Albert Einstein.

<https://www.einstein.br/ensino/Paginas/revista-einstein.aspx>

² Normas da Revista no anexo B.

Sericina e natação sobre parâmetros histomorfométricos do músculo plantar denervado de ratos Wistar

Sericin and swimming on histomorphometric parameters of the denervated plantar muscle of Wistar rats

André Junior Santana¹, Jean Carlos Debastian², Pamela Buratti³, Ana Luiza Pereti⁴, Regina Inês Kunz⁵, Rose Meire Costa Brancalhão⁶, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro⁷, Márcia Miranda Torrejais⁸, Gladson Ricardo Flor Bertolini⁹

1. Professor de Educação Física, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: andresantana_impacto@hotmail.com

2. Fisioterapeuta, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: jc.fisio@hotmail.com

3. Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: pamela_buratti@hotmail.com

4. Fisioterapeuta, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: analuiza-p@hotmail.com

5. Fisioterapeuta, Doutora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil, e-mail: regina_kunz@hotmail.com

6. Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: rosecb@gmail.com

7. Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: lucineia.cr@gmail.com

8. Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: mmtorrejais@yahoo.com.br

9. Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: gladsonricardo@gmail.com

Autor correspondente:

Gladson Ricardo Flor Bertolini
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE),
Rua Universitária, nº 2069 – CEP 85819-110 – Telefone: (45) 3220-7344 Cascavel –
Paraná - E-mail: gladsonricardo@gmail.com

RESUMO

Introdução: As lesões nervosas periféricas (LNP) causam uma série de alterações morfológicas, resultando em complicações funcionais, nervosas e musculares. Várias são as medidas terapêuticas aplicadas na reabilitação. O exercício físico pode auxiliar na manutenção das propriedades musculares e na melhora funcional, bem como o uso de substâncias biocompatíveis, como a sericina, uma proteína extraída do bicho-da-seda *Bombyx mori*. **Objetivo:** Analisar o efeito da proteína sericina associada ao exercício físico de natação na histomorfometria do músculo plantar de ratos Wistar. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 40 ratos adultos divididos aleatoriamente em 5 grupos, com 8 animais cada: controle, lesão, sericina, natação, natação e sericina. Três dias após a compressão do nervo isquiático, os grupos exercício e exercício e sericina foram submetidos ao exercício físico de natação durante 21 dias. Feito isso, os animais foram sacrificados e o músculo plantar processado. **Resultados:** Não houve diferença da área da secção transversa entre os grupos, quantidade de núcleos periféricos, quantidade de fibra, relação núcleo/fibra e diâmetro menor. A análise morfológica revelou que no grupo exercício ocorreu hipertrofia das fibras, assim como no grupo exercício e sericina e lesão foi evidente o dano muscular. O percentual de conjuntivo intramuscular parece ter sido mantido no grupo exercício em relação aos demais grupos. **Conclusão:** A associação da proteína sericina ao exercício físico de natação não foi eficiente na melhora das propriedades musculares, embora a aplicação do exercício físico tenha sido eficiente na manutenção do conjuntivo intramuscular e no não agravamento dos efeitos deletérios consequentes da LNP.

Palavras-chave: Nervos periféricos, fibra muscular, exercício físico, lesão nervosa, proteína da seda.

ABSTRACT

Introduction: Peripheral nerve lesions (LNP) cause a series of morphological changes, resulting in functional, nervous and muscular complications. There are several therapeutic measures applied in rehabilitation. Physical exercise may help maintain muscle properties and functional improvement, as well as the use of biocompatible substances such as sericin, a protein extracted from the *Bombyx mori* silkworm. **Objective:** To analyze the effect of the sericin protein associated with swimming exercise on the histomorphometry of the plantar muscle of Wistar rats. **Materials and Methods:** 40 adult rats randomly divided into 5 groups with 8 animals each were used: control, injury, sericin, swimming, swimming and sericin. Three days after compression of the sciatic nerve, exercise and exercise groups and sericin were submitted to physical swimming exercise for 21 days. Afterwards, the animals were euthanized and the plantar muscle was processed. **Results:** There was no difference in the cross-sectional area between groups, number of peripheral nuclei, amount of fiber, core / fiber ratio and minor diameter. The morphological analysis revealed that in the exercise group there was hypertrophy of the fibers, just as in the exercise group and sericin and injury muscle injury was evident. The percentage of intramuscular collagen seems to have been maintained in the exercise group in relation to the other groups. **Conclusion:** The association of sericin protein and swimming exercise was not efficient in improving muscle properties. Although the application of physical exercise has been efficient in maintaining intramuscular collagen and in not worsening the deleterious effects consequent to LNP.

Keywords: Peripheral nerves, muscle fiber, physical exercise, nerve injury, silk protein.

INTRODUÇÃO

A lesão nervosa periférica (LNP, doravante) pode resultar em perda parcial ou total da função sensorial, autonômica e motora, incluindo retração tecidual, dor e edema, além de diversas outras complicações secundárias (1). Em países desenvolvidos, a ocorrência anual das LNPs é estimada entre 13 a 23 casos a cada 100.000 habitantes, incidindo principalmente na população economicamente ativa, como em jovens entre 21 e 30 anos (2).

Incluso nos modelos experimentais de compressão nervosa, o nervo isquiático de ratos é muito utilizado devido à sua característica morfológica, bem como fácil acesso cirúrgico e por possuir dados prévios para comparação (3). Uma das características da compressão nervosa é a fraqueza dos músculos do membro pélvico (4), produzindo denervação muscular que leva à atrofia, à fibrose, à dilatação transitória do leito capilar intramuscular, causando aumento no volume sanguíneo e do fluido extracelular, além do aumento da proteólise (5).

As fibras musculares possuem sua integridade morfológica e funcional mantido pelo tecido conjuntivo, matriz extracelular rica em carboidratos e em proteínas (6). Apresenta várias funções, entre elas, a capacidade de preencher o espaço entre as fibras musculares, permitindo a união e o alinhamento entre elas, bem como coordenar a transmissão de força pelo músculo e transmitir o movimento resultante para o tendão e o osso; é também um tecido de sustentação para nervos e vasos sanguíneos, além de lubrificar as estruturas, facilitando o deslizamento (7).

Sabe-se que a musculatura esquelética possui a capacidade de se regenerar rapidamente, mesmo após danos considerados graves, devido à plasticidade neuromuscular (8). O sistema nervoso periférico (SNP) também compartilha de boa capacidade de recuperação; porém, o resultado funcional é muitas vezes pobre, principalmente por que os axônios lesados podem estar muito distante de seus órgãos-alvo, para restabelecer conexão (2).

Dentre as estratégias terapêuticas utilizadas para reabilitação, está o exercício físico de natação, que consiste em uma atividade voltada para a melhora das propriedades musculares, por meio do treinamento aeróbico (9). Nesse sentido, estudos vêm mostrando os benefícios dos exercícios físicos tanto na regeneração muscular, como na prevenção da atrofia, além de apresentarem uma melhora nas propriedades estruturais do músculo. Todavia, seus efeitos no músculo esquelético,

após lesão compressiva do nervo isquiático, são um aspecto discutido, especialmente com relação ao tipo de exercício, à sua intensidade e ao melhor período para ser iniciado (10,11).

Assim como o exercício físico, o uso de materiais biocompatíveis se faz pertinente. Entre esses materiais, as proteínas fibroína e sericina, extraídas do casulo do bicho-da-seda, estão sendo pesquisadas em vários campos das ciências da saúde (12). Peptídeos da proteína sericina, associados ao exercício físico, melhoram o desempenho aeróbico, a oxidação de gordura e o aumento de testosterona (13,14). A sericina também se mostra biocompatível tanto no tratamento de queimaduras quanto na cicatrização de feridas (15). Embora suas características biológicas a tornem potencialmente promissora, a sua potencial ação sobre a regeneração neuromuscular e a sua associação com outras estratégias terapêuticas, como o exercício de natação, ainda se mostram inexploradas.

Considerando a alta incidência de lesões nervosas periféricas e seus efeitos sobre a musculatura estriada esquelética, bem como os potenciais benefícios do exercício físico de natação e a sua associação com a proteína sericina, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da sericina associada à natação, na histomorfometria do músculo plantar, após lesão compressiva do nervo isquiático de ratos *Wistar*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar*, com peso de $334\pm 35,2$ g, mantidos em fotoperíodo claro-escuro de 12 horas, com temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, e água e ração fornecidos *ad libitum*. Os animais foram separados aleatoriamente em 5 grupos experimentais, com 8 ratos em cada grupo, sendo: controle (Ct), lesão (Ls), sericina (Ser), natação (Nat) e sericina e natação (Ser+Nat). Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE.

Protocolo experimental de compressão isquiática

Para o modelo experimental de compressão nervosa, do tipo axonotmese no nervo isquiático, os animais dos grupos Ls, Ser, Nat e Ser+Nat foram pesados e anestesiados previamente ao procedimento cirúrgico com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (DOPALEN/CEVA, Brasil) (95 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (ANASEDAN/CEVA, Brasil) (12 mg/Kg). Após verificação do estado de consciência do animal (observado pela ausência de resposta motora ao pinçamento da cauda e pregas interdigitais), ele foi posicionado em decúbito ventral, mantendo-se os membros escapulares e pélvicos em abdução e feita a tricotomia em terço médio da coxa pélvica direita.

Em seguida, foi realizada uma incisão paralela às fibras do músculo bíceps femoral, expondo o nervo isquiático e o comprimindo, com uso de pinça hemostática, por um período de 30 segundos. A pressão gerada foi padronizada pelo fechamento da pinça no 2º dente da cremalheira (16). Após o pinçamento, foi realizada uma marcação no local da lesão, por sutura epineural, utilizando fio de nylon 10.0. Os grupos Ser e Ser+Nat receberam diretamente sobre a lesão nervosa a aplicação de 100 µL da proteína sericina, uma única vez, durante o procedimento cirúrgico. Após o pinçamento, o nervo foi realocado, realizada sutura cutânea com pontos simples, utilizando fio de nylon monofilamento, aplicado polivinilpirrolidona-iodo (*Povidine*®) sobre a incisão e, então, os animais foram alojados nas mesmas condições pré-cirúrgicas.

Protocolo de exercício físico de natação com sobrecarga

O protocolo de exercício físico de natação foi adaptado de Bertolini et al. (17). Somente os grupos Nat e Ser+Nat foram submetidos ao exercício físico, embora os demais grupos foram expostos ao meio aquático, por 10 segundos, no período do tratamento, para que o estresse do meio fosse o mesmo para todos os grupos. Todos os animais foram adaptados e treinados a nadar de forma gradual nos quinze dias que antecederam o protocolo de lesão nervosa. O tratamento com a natação iniciou no 3º dia pós-operatório (PO). Esse processo foi realizado em um tanque de formato oval, com 60 cm de profundidade e capacidade para duzentos litros, sendo a aplicação do

exercício físico realizada com nível da água em 40 cm de profundidade e temperatura da água controlada a 32°C.

Os animais foram pesados antes de todas as sessões a fim de se estabelecer a carga aplicada durante o exercício, sendo 10% da massa corporal do animal, representadas por chumbos que foram fixados na região do abdômen com o auxílio de fita velcro. O protocolo seguiu por três semanas, sendo de segunda à sexta, totalizando 21 dias de tratamento, com carga progressiva de tempo: 1ª semana, após a lesão, 15' de natação; 2ª semana, após a lesão, 20' de natação e 3ª semana, após a lesão, 25' de natação.

Análises morfológicas e morfométricas

Após 24 horas da última sessão de tratamento, os animais foram pesados e anestesiados, decapitados em guilhotina e, então, o músculo plantar foi dissecado e o segmento proximal foi processado para a avaliação morfológica (18).

Para o estudo das fibras musculares, o músculo foi mantido à temperatura ambiente durante 30 a 40 minutos. Após esse tempo, o material foi coberto com talco para a preservação do tecido de acordo com técnica proposta por Moline e Glenner (19), e congelado em nitrogênio líquido durante dois minutos, acondicionados em criotubos e armazenados em Biofreezer a -80°C para posterior processamento. Os segmentos musculares congelados foram transferidos para câmara de criostato (LUPETEC CM 2850 Cryostat Microtome) a -20°C e mantidos durante 30 minutos para estabilização da temperatura. Em seguida, esses segmentos foram seccionados transversalmente (7 µm de espessura) em cortes semisseriados, os quais foram desidratados, diafanizados e montadas as lâminas com auxílio de Permout (Fisher Scientific®, New Jersey, U.S.A.). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise geral do tecido muscular e com Tricrômico de Masson (TM) para análise do tecido conjuntivo.

As lâminas obtidas foram analisadas em microscópio de luz (BX60 Olympus®, Tóquio, Japão), e para a mensuração da área de secção transversa e menor diâmetro da fibra muscular foram obtidas aleatoriamente 10 imagens na objetiva de 40x, sendo que em cada imagem foram mensuradas 10 fibras pelo programa *Image-Pro-Plus* 6.0 (Media Cybernetics®, Silver Spring, USA), totalizando 100 mensurações por animal.

Para determinar a densidade do tecido conjuntivo, o número de fibras e os núcleos periféricos foram obtidas aleatoriamente 10 imagens na objetiva de 40x e realizado as 10 mensurações por animal.

Na análise da densidade do tecido conjuntivo do endomísio e do perimísio foi utilizado o programa *GIMP* (GNU Programa de Manipulação de Imagens) 2.0 (GNU General Public License®, Berkeley, Califórnia). A área relativa do tecido conjuntivo (densidade da área) foi calculada dividindo o total de *pixels* da microfotografia pelo total de *pixels* da marcação do tecido conjuntivo.

As fibras musculares e os núcleos presentes foram morfologicamente identificados, marcados e contabilizados. Para calcular a razão núcleo por fibra, foi realizada a divisão do número total de núcleos pelo número total de fibras musculares, presentes no mesmo campo visual. Para evitar erro de amostragem, foram excluídas as fibras e os núcleos periféricos projetados sobre a borda superior e esquerda de cada microfotografia.

Análise estatística

Os dados foram analisados com auxílio do programa *bioestat*® 5.0 e apresentados como média e desvio-padrão. Foi utilizada a ANOVA unidirecional, com pós-teste *t* (LSD). Para todas as análises foi considerado nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Análises histomorfométricas do músculo plantar

As análises histomorfométricas do músculo plantar no tocante à área de secção transversa, à quantidade de fibras e de núcleos periféricos, à relação núcleo/fibra, ao menor diâmetro e densidade do tecido conjuntivo do endomísio e perimísio são apresentadas na Tabela 1. Com relação à Área, o número de fibras e diâmetro menor e número de fibras, apenas o grupo Ct foi diferente estatisticamente; entre os demais grupos não houve diferença entres eles. O número de núcleos e a relação núcleo/fibra não apresentaram diferença estatística em nenhum grupo analisado. Quanto ao tecido conjuntivo intramuscular, grupos grupos Ls, Ser e Ser+Nat apresentaram aumento significativo em relação ao grupo Ct, de 156%, 67% e 58%, respectivamente. Ainda, o grupo Ls apresentou diferença significativa em relação aos grupos tratados, Ser, Nat e Ser+Nat, com aumento de 53%, 115% e 62%,

respectivamente. Além disso, o grupo Ser também apresentou diferença significativa em relação ao grupo Nat, com aumento de 40% do conjuntivo intramuscular.

Os resultados demonstram que o exercício físico não se mostrou eficiente quanto à melhora ou à mudança das propriedades musculares do grupo Ls, embora não se mostrou como agravante, além de ter sido eficiente na manutenção do conjuntivo intramuscular, quando utilizado isoladamente como modalidade terapêutica, em comparação aos demais protocolos de tratamento. Tanto a sericina isolada (Ser), quanto associada (Ser+Nat) não foram eficientes como modalidade terapêutica, quando comparadas ao grupo Nat.

Análise morfológica do músculo plantar

No grupo Ct, o músculo plantar apresentou fibras normais com manutenção do formato poligonal, mionúcleos na periferia, em posição subsarcolemal junto à membrana celular e à manutenção do padrão fascicular (conjuntivo em feixes), sem alteração aparente do perímio e endomíio, além da presença de capilares sanguíneos.

No grupo Ls, o músculo plantar apresentou danos decorrentes da denervação. As fibras apresentaram contornos irregulares com desorganização fascicular e aumento do conjuntivo intramuscular, perda do formato poligonal (fibras polimórficas), diminuição de tamanho, atrofia e mionúcleos periféricos aumentados, embora não relevante estatisticamente. Já o grupo Ser apresentou fibras musculares com menor área, polimorfismo e fibras atroficas. O tecido conjuntivo possui um padrão tecidual mais espesso, mionúcleos periféricos aumentados e centralizados, além da maior presença de capilares sanguíneos.

O grupo Nat apresentou hipertrofia de algumas fibras musculares, aumento aparente da quantidade de mionúcleos periféricos, núcleos centralizados, muitos dos quais apresentam halos basófilos circundante e mioblastos no local da lesão. Possui organização tecidual normal. No grupo tratado com associação da sericina e natação (Ser+Nat), o músculo plantar apresentou leve desorganização do tecido conjuntivo e mionúcleos periféricos aumentados. As fibras se apresentaram com formato poligonal e algumas hipertrofiadas, além da presença de núcleos centrais e halo basófilo circundante (Figura 1).

DISCUSSÃO

O modelo de compressão do nervo isquiático realizado no presente estudo reproduziu a lesão do tipo axonotmese (16), que se caracteriza pela interrupção do estímulo neuromuscular, pois alterou a morfologia do músculo plantar dos animais do grupo Ls, demonstrando características específicas de dano muscular causado por denervação, como fibras polimórficas e de menor diâmetro, aumento na densidade do tecido conjuntivo, além da presença de núcleos centrais.

A análise morfológica do presente estudo demonstrou que a lesão nervosa foi capaz de alterar a morfologia do músculo plantar, quando comparado com o grupo controle. Resultados semelhantes com relação à alteração da morfologia do músculo estriado esquelético, após LNP, também são descritos pela literatura. Malysz et al. (11) relatam alterações estruturais, além de atrofia muscular esquelética, após lesão nervosa isquiática por axonotmese. Rosa Júnior et al. (20) também descrevem alterações na fibra muscular esquelética do músculo extensor longo dos dedos (EDL) e sóleo, após lesão nervosa isquiática. Ainda, Cavalcante et al. (21) discorrem que o conjunto dessas alterações morfológicas leva à diminuição da massa, do diâmetro da fibra e da produção de força, comprometendo a funcionalidade do órgão.

No que diz respeito ao tratamento com sericina, a morfologia revelou aspecto tecidual semelhante ao grupo lesão, demonstrando que a proteína pode ter se comportado de maneira pró-inflamatória como tratamento. Contudo, a morfologia do músculo plantar em relação ao tratamento com natação revelou-se com aspectos teciduais similares ao grupo controle, com tentativa de recuperação celular, demonstrando que o exercício físico de natação agiu de forma positiva como tratamento. O mesmo ocorreu com a associação dos tratamentos Ser+Nat, que apresentou aspectos teciduais semelhantes ao grupo Nat e Ct, também com tentativa de recuperação tecidual. Podemos discorrer com base na análise morfológica que os grupos Nat e Ser+Nat, foram os que apresentaram melhores aspectos teciduais e que o efeito inflamatório da sericina de alguma maneira foi atenuado pelo exercício físico de natação, quando associados. Porém, vale ressaltar que as alterações morfológicas ocorrem de maneira pontual.

Como as análises foram realizadas 22 dias após a lesão nervosa, foi possível verificar alguns sinais de regeneração muscular, como a presença de núcleos centralizados na fibra e aglomerados de fibroblastos, indicativo de síntese proteica

(22), tentativa de recuperação tecidual como um todo em resposta à lesão orgânica. Uma resposta semelhante foi observada por Tanaka et al. (10), que verificaram a recuperação espontânea do músculo sóleo após 6 semanas de lesão do nervo tibial.

A literatura apresenta resultados satisfatórios quanto ao uso do exercício físico como estratégia terapêutica (10,11), na manutenção e na melhora da morfologia muscular, após LNP. O exercício físico é capaz de promover a hipertrofia muscular (9), bem como contribuir na prevenção da atrofia (10). O exercício de natação foi escolhido por permitir a atividade aeróbia com sobrecarga cardiorrespiratória, devido às propriedades da água, como a viscosidade, que oferece resistência aos movimentos em qualquer direção (23). Todavia, o presente trabalho não apresentou dados corroborativos para os tratamentos utilizados nos grupos Nat e Ser+Nat, sobre a atrofia muscular decorrente da lesão isquiática. Provavelmente, o protocolo de treino escolhido, resistência com sobrecarga (10% da massa corporal), não tenha sido suficiente para gerar aumento de massa muscular a ponto de minimizar a atrofia muscular. Artifon et al. (24) também não verificaram mudanças nos parâmetros morfométricos do músculo esquelético de ratos, submetidos à neuropraxia e tratados com exercício físico de natação progressiva, similar ao protocolo utilizado no presente estudo, embora sem sobrecarga.

Ademais, o exercício de natação utilizado no presente trabalho não se mostrou como fator agravante aos sinais degradantes, subsequentes à compressão nervosa, talvez devido ao menor impacto das estruturas e ao menor estresse às fibras musculares, comparando com o exercício em solo, em virtude das propriedades de empuxo, de viscosidade e de temperatura da água, bem como sobrecarga e duração total do treino utilizado.

A remodelação tecidual é mediada por várias citocinas e fatores de crescimento, que regulam a fibrogênese na cicatrização de feridas, na lesão de músculos lacerados e na denervação, tais como o fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF- β 1), Metaloproteinase de matriz (MMPs) e Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS). Ozawa et al. (25) descreveram algumas mudanças nesses reguladores na fase inicial de remodelação (3^o, 7^o e 14^o dias) no músculo esquelético de ratos, após denervação isquiática completa. Dessa maneira, é importante compreender os mecanismos por trás das alterações neuromusculares advindas da LNP, afim de

possibilitar o conhecimento necessário para a intervenção terapêutica, que seja promissora na recuperação funcional do sistema neuromuscular.

O tecido conjuntivo é responsável pela integridade morfológica e funcional do músculo esquelético, sendo que esse sofre adaptações após estímulos, como na denervação entre outros (26,27). No presente estudo, houve aumento do conjuntivo intramuscular, sendo que o grupo Ls, Ser e Ser+Nat apresentaram aumento significativo em relação ao grupo Ct, de 156%, 67% e 58%, respectivamente. Ainda, o grupo Ls apresentou diferença significativa em relação aos grupos tratados Ser, Nat e Ser+Nat, com aumento de 53%, 115% e 62%, respectivamente. Além disso, o grupo Ser também apresentou diferença significativa em relação ao grupo Nat, com aumento de 40% do conjuntivo. O aumento do colágeno intramuscular também foi descrito por Salonen et al. (26), no músculo gastrocnêmio, após lesão nervosa isquiática. Ozawa et al. (25) verificaram aumento do colágeno no músculo esquelético após denervação isquiática completa, com aumento de 80% na expressão do colágeno no 14º dia após a lesão.

Segundo Minamoto (28), a denervação do músculo esquelético pode aumentar a densidade do tecido conjuntivo, que responde à lesão com proliferação de fibroblastos e síntese de componentes da matriz extracelular, sendo que, durante o reparo celular, ocorre aumento da síntese de colágeno tipo III, principalmente no perimísio e endomísio. O aumento na densidade da área do tecido conjuntivo ocorre devido à proliferação do colágeno tipo I, no endomísio e perimísio, e por possuir menor elasticidade pode levar o músculo à diminuição da elasticidade, prejudicando assim a funcionalidade muscular (26,28).

Observou-se no presente estudo que houve a manutenção do conjuntivo intramuscular no grupo tratado com exercício de natação, demonstrando que o exercício físico, embora não tenha sido eficaz na recuperação da morfologia muscular como um todo, foi eficiente evitando o agravamento das consequências musculares deletérias advindas da LNP. O oposto foi demonstrado pelo grupo tratado com a proteína sericina, que apresentou um acréscimo na densidade do conjuntivo, sendo que a associação de ambos os tratamentos (natação e sericina) não apresentou resultados potencializadores.

Neste estudo, a associação da proteína sericina ao exercício de natação na fase aguda não foi uma modalidade terapêutica eficaz na melhora das consequências

deletérias, advindas da LNP, embora o exercício físico, quando aplicado sozinho, foi eficaz na manutenção da proporção de conjuntivo. É de extrema importância que profissionais da saúde entendam a íntima integração entre o sistema nervoso e músculoesquelético e sua aplicabilidade clínica, sendo as condutas terapêuticas contemplativas para ambos, músculo e nervo, assim como as estruturas periarticulares envolvidas na lesão nervosa, a fim de acelerar o processo regenerativo, visando ao retorno da funcionalidade ao paciente.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a axonotmese no nervo isquiático foi capaz de promover efeitos de lesão muscular 22 dias após a lesão, e que a associação da proteína sericina ao exercício físico de natação não acelerou o processo de recuperação muscular. No entanto, o exercício de natação manteve a densidade do tecido conjuntivo intramuscular. Sendo assim, fica explícita a necessidade da prática do exercício físico como modalidade terapêutica após lesão nervosa compressiva, para que se mantenham as propriedades teciduais necessárias para que o processo de reparo seja eficiente.

Agradecimentos:

Centro de reabilitação física – CRF – Unioeste – Cascavel-PR.

REFERÊNCIAS

1. Silva CK, Camargo EA. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas. *Saúde e Pesqui.* 2010;3(1):93–8.
2. Li R, Liu Z, Pan Y, Chen L, Zhang Z, Lu L. Peripheral nerve injuries treatment: a systematic review. *Cell Biochem Biophys.* 2014;68(3):449–54.
3. Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods.* 2015;243(1):39–46.
4. Kobayashi S, Yoshizawa H, Yamada S. Pathology of lumbar nerve root compression Part 2: morphological and immunohistochemical changes of dorsal root ganglion. *J Orthop Res.* 2004;22(1):180–8.
5. Kääriäinen M, Kauhanen S. Skeletal muscle injury and repair: the effect of disuse and denervation on muscle and clinical relevance in pedicled and free muscle flaps. *J Reconstr Microsurg.* 2012;28(1):581–7.
6. Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle nerve.* 2012;44(3):318–31.
7. Purslow PP. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol.* 2002;133(4):947–66.
8. Fernandes T, Soci UP, Alves CR, Carmo EC, Barros JG, Oliveira EM. Determinantes moleculares da hipertrofia do músculo esquelético mediados pelo treinamento físico: estudo de vias de sinalização. *Rev Mackenzie Educ Fís Esporte.* 2008;7(1):169–88.
9. Simionato LH, Henrique C, Bortoluci F, Yone M, Souza F De, Furtado MN, et al. Comparison of the effect of physical swimming training load and off load in the striated skeletal muscle of rats. *Salusvita.* 2015;34(2):251–63.
10. Tanaka S, Tsubaki A, Tachino K. Effect of exercise training after partial denervation in rat soleus muscles. *J Phys Ther Sci.* 2005;17(2):97–101.
11. Malysz T, Ilha J, Nascimento PS, Heuser MCF, Angelis K. Exercise training improves the soleus muscle morphology in experimental diabetic nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 2011;44(4):571–82.
12. Rajput SK, Singh MK. Sericin – a unique biomaterial. *J Polym Text Eng.* 2015;2(3):29–35.
13. Shin S, Yeon S, Park D, Oh J, Kang H, Kim S, et al. Silk amino acids improve physical stamina and male reproductive function of mice. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(2):273–8.
14. Kim J, Hwang H, Yun H-Y, Kim B, Lee C-H, Suh H, et al. Silk peptide intake increases fat oxidation at rest in exercised mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2013;59(3):250–5.
15. Aramwit P, Palapinyo S. Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. *Arch Dermatol Res.* 2013;305(1):585–94.
16. Câmara CN da S, Brito MVH, Silveira EL, Silva DSG da, Simões VRF, Ponte RWF. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. *Acta Cirúrgica Bras.* 2011;26(1):12–8.
17. Bertolini GRF, Merigo C, Artifon EL, Cunha DM, Meireles A. Treinamento com natação sobre a avaliação funcional da nocicepção ciática em ratos. *Rev Bras Reumatol.* 2011;51(3):249–59.
18. Junqueira LC, Carneiro J. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos. 1983. 435 p.
19. Moline SW, Glenner GG. Ultrarapid tissue freezing in liquid nitrogen. *J*

- Histochem e Cytochem. 1964;12(10):777–83.
20. Rosa Junior GM, Bueno de S, Simionato LH, Henrique C, Bortoluci F. Efeito da associação da laserterapia com a natação no reparo morfológico do nervo isquiático e na recuperação funcional de ratos submetidos à axonotmese. *Fisioter e Pesqui.* 2016;23(1):12–20.
 21. Cavalcante EV, Silva LG, Montenegro EJ, Filho NT. Efeito da eletroestimulação no músculo desnervado de animais: revisão sistemática. *Fisioter e Mov.* 2012;25(3):669–78.
 22. Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo.* 2009;23(5):779–96.
 23. Candeloro JM, Caromano FA. Discussão crítica sobre o uso da água como facilitação, resistência ou suporte na hidrocinesioterapia. *Acta Fisiátrica.* 2006;13(1):7–11.
 24. Artifon EL, Silva LI, Ribeiro L de FC, Brancalhão RMC, Bertolini GRF. Treinamento aeróbico prévio à compressão nervosa: análise da morfometria muscular de ratos. *Rev Bras Med do Esporte.* 2013;19(1):66–9.
 25. Ozawa J, Kurose T, Kawamata S, Kaneguchi A, Moriyama H, Kito N. Regulation of connective tissue remodeling in the early phase of denervation in a rat skeletal muscle. *Biomed Res.* 2013;34(5):251–8.
 26. Salonen V, Lehto M, Kalimo M, Penttinen R, Aro H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle Nerve.* 1985;8(2):125–31.
 27. Teodori RM, Minamoto VB. A influência da imobilização sobre o tecido conjuntivo muscular: uma revisão. *Fisioter em Mov.* 2007;20(3):87–92.
 28. Minamoto VB. Effect of denervation on skeletal muscle: a review. *Fisioter em Mov.* 2007;20(3):63–9.

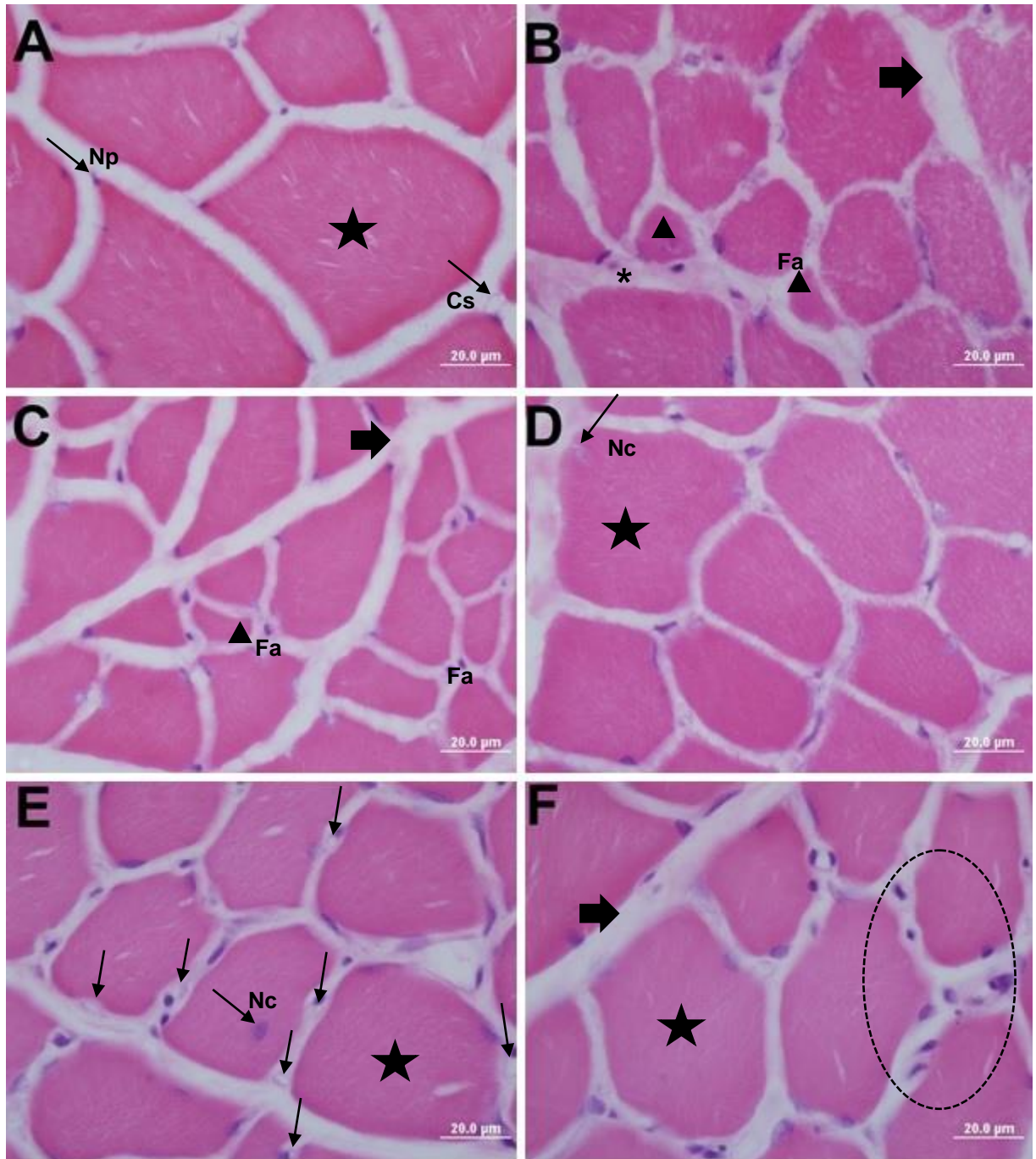


Figura 1: Fotomicrografia da secção transversal do músculo plantar de ratos Wistar coloração Hematoxilina e Eosina. Grupo Ct (A), Grupo Ls (B), Grupo Ser (C), Grupo Nat (D) e Grupo Ser+Nat (E,F). Em A, observa-se fibras musculares com formato poligonal (estrela), núcleos periféricos (Np) e capilares sanguíneos (Cs). B, fibras musculares Atrofiadas (triângulo), aumento na densidade do conjuntivo (seta grande), fibroblastos (*). Em C, fibras atroficas (triângulo) e fibras polimórficas. Em D, fibra muscular hipertrofica (estrela) e núcleo centralizando (Nc). Em E, fibras hipertroficas (estrela), presença de núcleo central (Nc), e aumento dos capilares sanguíneos (setas verticais). Em F, aumento na quantidade de núcleos periféricos (elipse tracejada), fibra hipertrofica (estrela) e espessamento do conjuntivo (seta grande).

Tabela 1 – Medidas da área das fibras musculares, diâmetro menor, nº de fibras, nº de núcleos, Relação núcleo/fibra e conjuntivo intramuscular do músculo plantar de ratos *Wistar* do grupo (Ct), (Ls), (Ser), (Nat) e (Ser+Nat).

Parâmetros	(Ct)	(Ls)	(Ser)	(Nat)	(Ser+Nat)
Área	2740,9±254,0 ^a	1533,7±279,9 ^b	1584,5±220,6 ^b	1498,3±181,9 ^b	1452,5±341,2 ^b
D. menor	43,6±1,3 ^a	33,4±3,6 ^b	34,7±3,0 ^b	33,1±1,6 ^b	32,3±4,6 ^b
Nº de Fibras	343,2±52,9 ^a	522,7±48,3 ^b	634,2±187,6 ^b	551,8±82,5 ^b	555,2±120,0 ^b
Nº de núcleos	364,8±95,6 ^a	609,5±191,2 ^a	526,2±117,4 ^a	693,0±224,5 ^a	679,4±243,3 ^a
R. núcleo/fibra	1,1±0,3 ^a	1,1±0,3 ^a	0,9±0,3 ^a	1,2±0,2 ^a	1,3±0,7 ^a
Conjuntivo %	2,6±0,6 ^a	6,7±1,1 ^b	4,3±1,0 ^{cd}	3,1±0,8 ^{ae}	4,1±1,5 ^{de}

Letras Diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$). Valores expressos por média ± desvio padrão.

5 ARTIGO CIENTÍFICO:

ASSOCIATION OF SERICIN PROTEIN AND SWIMMING ON THE PHENOTYPE, MOTOR PLATE AND FUNCTIONALITY OF THE DENERVATED PLANTAR MUSCLE OF WISTAR RATS

Que será submetido para o Journal of Exercise Rehabilitation (JER).

<https://www.e-jer.org/>

² Normas da Revista no anexo B.

Association of sericin protein and swimming on the phenotype, motor plate and functionality of the denervated plantar muscle of Wistar rats

André Junior Santana¹, Jean Carlos Debastian², Regina Inês Kunz³, Pamela Buratti⁴, Rose Meire Costa Brancalhão⁵, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro⁶, Márcia Miranda Torrejais⁷, Gladson Ricardo Flor Bertolini⁸

1. Professor de Educação Física, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: andresantana_impacto@hotmail.com

2. Fisioterapeuta, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: jc.fisio@hotmail.com

3. Fisioterapeuta, Doutora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil, e-mail: regina_kunz@hotmail.com

4. Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: pamela_buratti@hotmail.com

5. Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: rosecb@gmail.com

6. Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: lucineia.cr@gmail.com

7. Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: mmtorrejais@yahoo.com.br

8. Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil, e-mail: gladsonricardo@gmail.com

Autor correspondente:

André Junior Santana

Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE),

Rua Universitária, nº 2069 – CEP 85819-110 – Telefone: (45) 3220-7405 Fax: (45) 3220-3132, Cascavel –Paraná - E-mail: andresantana_impacto@hotmail.com

Resumo:

Introdução: A lesão nervosa periférica (LNP) pode resultar em perda parcial ou total da função sensorial, autonômica e motora, incluindo dor e edema, além de diversas complicações secundárias. Várias são as medidas terapêuticas aplicadas na reabilitação. O exercício físico pode auxiliar na manutenção das propriedades musculares e na melhora funcional, o que pode ser potencializado pelo uso de substâncias biocompatíveis, como a proteína sericina. **Objetivo:** Analisar o efeito da sericina associada ao exercício físico de natação no fenótipo, na inervação e na funcionalidade do músculo plantar de ratos *Wistar*. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 40 ratos adultos separados aleatoriamente em 5 grupos de 8 animais: controle, lesão, sericina, exercício, exercício e sericina. A aplicação da sericina foi feita *in loco*, 100 µL, logo após a compressão nervosa. Três dias após a compressão do nervo isquiático, o grupo natação e natação e sericina foram submetidos ao exercício físico de natação durante 21 dias. Na sequência, os animais foram eutanasiados e o músculo plantar foi dissecado e submetido às técnicas histoquímica e histoenzimológica. **Resultados:** O teste de força de preensão não revelou alterações na funcionalidade muscular, sendo que o controle apresentou maior massa muscular em relação aos demais grupos; o mesmo não ocorrendo para o comprimento muscular. Junções neuromusculares polimórficas foram detectadas nos grupos, embora sem alterações morfométricas significativas da área, diâmetro maior e menor. O percentual de fibras tipo I foi menor no grupo lesão; não houve diferença de fibras IIa e IIb entre os grupos. A área das fibras I, IIa e IIb se manteve constante entre os grupos. **Conclusão:** O biopolímero sericina associado ao exercício físico de natação não afetou a funcionalidade do músculo plantar, submetido à axonotmese experimental, cujas propriedades contráteis foram alteradas pela lesão nervosa.

Palavras-chave: Nervos periféricos, fibra muscular, exercício físico, lesão nervosa, proteína da seda.

Abstract:

Introduction: Peripheral nerve injury (LNP) can result in partial or total loss of sensory, autonomic and motor function, including pain and edema, in addition to several secondary complications. There are several therapeutic measures applied in rehabilitation. Physical exercise may help maintain muscle properties and functional improvement, which may be enhanced by the use of biocompatible substances, such as serine protein. **Objective:** To analyze the effect of sericin associated with swimming exercise on the phenotype, innervation and functionality of the plantar muscle of Wistar rats. **Materials and Methods:** 40 randomly divided adult rats were used in 5 groups of 8 animals: control, injury, sericin, exercise, exercise and sericin. The application of sericin was done on the spot, 100 µL, shortly after nerve compression. Three days after sciatic nerve compression, the swimming and swimming and sericin groups were submitted to physical swimming exercise for 21 days. Afterwards, the animals were euthanized and the plantar muscle was dissected and submitted to histochemical and histoenzimological techniques. **Results:** The grip strength test did not show alterations in muscular functionality, and the control presented greater muscle mass in relation to the other groups, the same did not occur for muscle length. Polymorphic neuromuscular junctions were detected in the groups, although without significant morphometric alterations of the area, major and minor diameter. The percentage of type I fibers was lower in the lesion group, there was no difference in fibers IIa and IIb

between the groups. The area of the fibers I, IIa and IIb remained constant between the groups. **Conclusion:** Sericin biopolymer associated with swimming exercise did not affect the plantar muscle function, submitted to experimental axonotmosis, whose contractile properties were altered by nerve injury.

Keywords: Peripheral nerves, muscle fiber, physical exercise, nerve injury, silk protein.

INTRODUÇÃO

A lesão nervosa periférica (LNP, doravante) pode resultar em diversas implicações, desde as sensoriais às autonômicas, incluindo hipotrofias, além de dor e edema, e de limitações funcionais advindas de um déficit de comunicação entre nervo e músculo (1). Estima-se que, em países desenvolvidos, a ocorrência anual de lesões esteja entre 13 a 23 casos a cada 100.000 habitantes, incidindo principalmente na população economicamente ativa (2).

Nos modelos experimentais de compressão nervosa, o nervo isquiático de ratos é muito utilizado devido à sua característica morfológica, bem como fácil acesso cirúrgico e por possuir dados prévios para comparação (3). Uma das características dessa compressão nervosa é a fraqueza dos músculos do membro pélvico (4), produzindo desnervação muscular que leva a atrofia, fibrose, dilatação transitória do leito capilar intramuscular, causando aumento no volume de sangue do músculo e conseqüentemente aumento do fluído extracelular, além do aumento da proteólise (5). Além dessas alterações, a ausência do estímulo nervoso acarreta a redução da isoforma lenta da cadeia pesada de miosina, com conseqüente aumento proporcional da cadeia pesada de miosina rápida (6).

As junções neuromusculares (JNMs, de ora em diante) possuem três elementos estruturais principais: a região pré-sináptica; a fenda sináptica e a região pós-sináptica (7). As JNMs são elementos do sistema nervoso que têm papel chave na transmissão do sinal entre os motoneurônios e as fibras musculares (8). O comprometimento da função da JNM resulta em fraqueza muscular ou paralisia, prejudica os gatilhos existentes que realizam sinalização no músculo esquelético, levando em última instância à perda grave de massa muscular (9). Observa-se também modificações na excitabilidade muscular, em que a energia necessária para excitar o músculo e a duração do pulso para produzir a contração tornam-se maiores (10).

Estudos mostram que tanto a desnervação como o exercício físico modificam as propriedades morfológicas das JNMs (11–13). Dentre as estratégias terapêuticas utilizadas na reabilitação estão os exercícios físicos de natação, que consistem em uma atividade voltada para a melhora das propriedades musculares, por meio do treinamento aeróbico (14), bem como na transformação fenotípica do músculo esquelético (15). Existem indícios tanto no tocante aos benefícios do exercício físico

na regeneração muscular, como na prevenção da atrofia e melhora nas propriedades estruturais do músculo. Todavia, seus efeitos no músculo esquelético, após lesão compressiva do nervo isquiático, são um aspecto muito discutido, especialmente no que diz respeito ao tipo de exercício, à sua intensidade e ao melhor período para ser iniciado (16,17).

Assim como o exercício físico, o uso de materiais biocompatíveis que possam auxiliar na recuperação muscular se faz pertinente. Entre esses materiais estão as proteínas da seda, fibroína e sericina, extraídas do casulo do bicho-da-seda, que atualmente estão sendo pesquisadas em vários campos das ciências da saúde (18). Peptídeos de sericina, associados ao exercício físico, melhoram o desempenho aeróbico, a oxidação de gordura e o aumento de testosterona (19,20). Resultados positivos também foram apresentados no uso da sericina para tratamento de queimaduras e de cicatrização de feridas (21). Embora apresente características promissoras, como biomaterial com potencial aplicação na saúde, a sua ação na regeneração neuromuscular, associada à estratégia terapêutica do exercício de natação, ainda se mostra inexplorada.

Considerando a alta incidência de lesões nervosas periféricas e seus efeitos sobre a musculatura estriada esquelética, bem como os potenciais benefícios do exercício físico de natação e da proteína sericina, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito da sericina associada ao exercício físico de natação no fenótipo, na placa motora e na funcionalidade do músculo plantar de ratos *Wistar*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar*, com peso de $334 \pm 35,2$ g, mantidos em fotoperíodo claro-escuro de 12 horas, com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com água e ração fornecidos *ad libitum*. Os animais foram separados aleatoriamente em cinco grupos experimentais, com oito ratos em cada grupo, sendo: controle (Ct), lesão (Ls), sericina (Ser), natação (Nat), e sericina e natação (Ser+Nat). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE.

Protocolo experimental de compressão isquiática

Para o modelo experimental de compressão nervosa, do tipo axonotmese no nervo isquiático, os animais dos grupos Ls, Ser, Nat e Ser+Nat foram pesados e

anestesiados previamente ao procedimento cirúrgico com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina(Dopalen) (95 mg/Kg) (CEVA-São Paulo-Brasil) e cloridrato de xilazina(Anasedan) (12 mg/Kg) (CEVA-São Paulo-Brasil). Após verificação do estado de consciência do animal (observado pela ausência de resposta motora ao pinçamento da cauda e pregas interdigitais), ele foi posicionado em decúbito ventral, mantendo-se os membros torácicos e pélvicos em abdução, quando foi realizada a tricotomia no terço médio da coxa pélvica direita.

Em seguida, realizou-se uma incisão paralela às fibras do músculo bíceps femoral, expondo o nervo isquiático e o comprimindo, utilizando, para isso, pinça hemostática, por um período de trinta segundos. A pressão gerada foi padronizada pelo fechamento da pinça no 2º dente da cremalheira. Após o pinçamento, foi realizada uma marcação no local da lesão, por sutura epineural, utilizando fio de nylon 10.0. Os grupos Ser e Ser+Nat receberam diretamente sobre a lesão nervosa a aplicação de 100 µL da proteína sericina, uma única vez, durante o procedimento cirúrgico. Após o pinçamento, o nervo foi realocado, realizada a sutura cutânea com pontos simples, utilizando fio de nylon monofilamento, aplicado polivinilpirrolidona-iodo (Povidine®) sobre a incisão e então, os animais foram alojados nas mesmas condições pré-cirúrgicas.

Protocolo de exercício físico de natação com sobrecarga

O protocolo de exercício físico de natação foi adaptado de Bertolini et al. (22). Somente os grupos Nat e Ser+Nat foram submetidos ao exercício físico, embora os demais grupos foram expostos ao meio líquido, por dez segundos, no mesmo período do tratamento, para que o estresse do meio aquático fosse o mesmo para todos os grupos. Todos os animais foram adaptados e treinados a nadar de forma gradual nos quinze dias que antecederam ao protocolo de lesão nervosa. A natação iniciou no terceiro dia pós-operatório (PO). Esse foi realizado em um tanque de formato oval, com 60 cm de profundidade e capacidade para duzentos litros, sendo a aplicação do exercício físico realizada com nível da água em 40 cm de profundidade e temperatura controlada a 32°C.

Os animais foram pesados antes de todas as sessões para estabelecer a carga aplicada durante o exercício físico, sendo 10% da massa corporal do animal, representadas por chumbos que foram fixados na região do abdome. O protocolo

seguiu por três semanas, sendo de segunda a sexta, totalizando 21 dias de tratamento, com carga progressiva de tempo: 1ª semana após a lesão 15' de natação, 2ª semana 20' de natação e 3ª semana 25' de natação.

Avaliação da força muscular de preensão

A função do teste de força de preensão foi a de verificar a funcionalidade por meio da força muscular dos ratos que sofreram compressão do nervo isquiático. Para realização da avaliação, utilizou-se um equipamento específico de mensuração de força de preensão, por meio do qual o animal foi tracionado pelo dorso com firmeza crescente e permitido que ele segurasse, com o membro pélvico direito, em uma grade conectada a um transdutor de força, (Figura 18), até que perdesse a preensão, adaptado de Bertelli e Mira (23).

O membro pélvico esquerdo foi imobilizado manualmente durante o teste. Os animais foram previamente adaptados e treinados no equipamento nos cinco dias que antecederam à cirurgia. A primeira avaliação (AV1) foi feita antes da compressão do nervo isquiático, para obtenção de valores basais. As avaliações foram utilizadas para observar a evolução da lesão e da forma de tratamento empregada. Em cada avaliação, o teste foi repetido três vezes e usado o valor médio das repetições (24). As demais avaliações foram realizadas no decorrer do experimento: 2º AV 3 PO, pré tratamento; 3º AV, 3 PO, pós tratamento; 4º AV, 7PO, pós tratamento; 5º AV, 8PO, pré-tratamento; 6ºAV, 14PO; pós-tratamento; 7ºAV, 21PO, pós-tratamento; 8ºAV, 22PO, eutanásia dos animais e coleta dos músculos.

Coleta do músculo plantar e análises histoquímica e histoenzimológica

Após 24 horas da última sessão de tratamento, os animais foram pesados e anestesiados, decapitados em guilhotina e então o músculo plantar foi dissecado, pesado e mensurado seu comprimento.

Para análise histoquímica das JNMs, a parte proximal do músculo foi fixada em Karnovsky. A avaliação das JNMs foi realizada pela técnica esterase Inespecífica (25). A análise morfométrica das JNMs foi realizada em duas lâminas para cada animal.

Em cada lâmina, foram avaliadas medidas da área, diâmetros maior e menor de aproximadamente 150 JNMs, a partir de imagens microscópicas com objetiva de 20x.

As fibras e JNMs do músculo plantar foram fotomicrografadas e capturadas em microscópio Olympus Bx60® acoplado a câmera Olympus DP71 (Tóquio, Japão), com o auxílio do programa DP Controller 3.2.1 276. Então, foram realizadas as análises morfológica e morfométrica das fibras e JNMs. Esse material foi analisado utilizando-se o programa Image Pro Plus 6.0® (Media Cybernetics, Maryland, USA).

Para o estudo histoenzimológico das fibras musculares, foi utilizado a classificação segundo a proposta de Brooke e Kaiser (26). A porção distal do músculo foi mantida em temperatura ambiente durante 30 a 40 minutos. Após esse tempo, o material foi coberto com talco neutro (JOHNSON®, São Paulo, Brasil) para a preservação do tecido de acordo com a técnica proposta por Moline e Glenner (27), e congelado em nitrogênio líquido durante dois minutos, acondicionados em criotubos e armazenados em Biofreezer a -80°C para posterior processamento. Os segmentos musculares congelados foram transferidos para câmara de criostato (LUPETEC CM 2850 Cryostat Microtome) a -20°C e mantidos durante 30 minutos para estabilização da temperatura. Em seguida, esses segmentos foram seccionados transversalmente (7 µm de espessura) em cortes semisseriados, os quais foram desidratados, diafanizados e montadas as lâminas com auxílio de Permount (Fisher Scientific®, New Jersey, U.S.A.). Os cortes transversais de 7 µm de espessura foram submetidos a técnica histoenzimológica de NADH-TR (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - Tetrazolium Reductase), para análise do metabolismo oxidativo e glicolítico das fibras musculares, que se baseia na capacidade da enzima mitocondrial NADH desidrogenase, em transferir elétrons para o sal de tetrazólio incolor, solúvel e convertê-lo num composto formazano. Isso proporciona excelente mancha da matriz intermiofibrilar. Para demonstrar, a atividade da NADH-TR evidenciou fibras musculares dos tipos I (diâmetro pequeno e intensa atividade oxidativa), IIa (diâmetro intermediário e moderada atividade oxidativa) e IIb (diâmetro grande e fraca atividade oxidativa) nos grupos estudados (Figura 2 A a E).

As análises morfométricas das fibras musculares foram realizadas por meio de mensurações da área de secção transversal e diâmetro menor do músculo plantar em aproximadamente 200 fibras por animal. Foram quantificados ainda os diferentes tipos

de fibras musculares (I, IIa e IIb), mediante a escolha aleatória de dois campos ($400\mu\text{m}^2$) por animal, a partir de imagens que foram capturadas com objetiva de 20x.

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados com valores de média e desvio-padrão. Foi utilizado ANOVA modelo misto para comparação da força de preensão e ANOVA unidirecional, com pós-teste t (LSD), para as comparações morfométricas. Para todas as análises foi considerado nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Análise funcional e parâmetros macroscópicos do músculo plantar

A análise de força do músculo plantar e as suas respectivas avaliações, bem como o seu peso e o seu comprimento são apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Os dados referentes à força de preensão apresentaram diferença significativa ($F(1,6;52,4)=51,6;p<0,001$), sendo que todos os grupos, Ls, Ser, Nat e Ser+Nat, mostraram valores menores do que Ct ($p<0,001$), e não teve diferença entre eles.

Com relação às avaliações, a primeira foi maior estatisticamente em relação às demais ($p<0,001$); não houve diferença entre as outras avaliações.

O parâmetro peso do músculo plantar revelou diferença significativa ($p<0,002$) na relação do grupo Ct com os demais grupos. Com relação ao comprimento do músculo ($p=0,862$), não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

Análise morfológica e morfométrica das JNMs.

O estudo morfológico mostrou JNMs com formato polimórfico, sendo redondo, oval e elíptico em todos grupos estudados (Figura 2). A análise morfométrica não evidenciou alterações significativas em relação à área, diâmetros maior e menor, nos grupos, Ct, Ls, Ser, Nat e Ser+Nat (Tabela 3).

Análise histoenzimológica do músculo plantar

Observou-se diferença estatisticamente significativa quanto à área das fibras do tipo I, do grupo Ct, para os demais grupos, não ocorrendo diferença significativa

entre os demais grupos (Tabela 4). Houve também diferença significativa da área das fibras do tipo IIa e IIb, em relação ao grupo Ct para os demais grupos, não havendo diferença entre eles (Tabela 4). Quanto ao diâmetro menor das fibras, houve diferença estatisticamente significativa dos tipos de fibras (I, IIa e IIb) entre os grupos, conforme (Tabela 6). Com relação à contagem das fibras musculares, houve diferença estatisticamente significativa para as fibras do tipo I do grupo Ct em relação aos demais grupos, sendo que o grupo Ls também apresentou diferença significativa em relação ao grupo Ser, Nat e Ser+Nat, com redução na contagem das fibras em 28%, 31% e 29%, respectivamente; não houve diferença entre os demais grupos. Já a contagem das fibras do tipo IIa e IIb não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 5).

Discussão

O modelo de compressão do nervo isquiático realizado no presente estudo reproduziu a lesão do tipo axonotmese (28), que se caracteriza pela interrupção do estímulo nervoso, produzindo alteração na morfologia muscular, direcionada à atrofia, sendo o principal efeito a redução da área da fibra e diâmetro, com consequente redução da força (29). Salvini et al. (30) relatam que o conjunto dessas alterações morfológicas comprometem a funcionalidade do órgão.

A análise histoenzimológica do presente estudo demonstrou que a lesão nervosa foi capaz de alterar a morfologia do músculo plantar de todos os grupos lesionados, quando comparados com o grupo controle, embora não a ponto de alterar as características específicas dos diferentes tipos de fibras.

Zhong et al. (31) descreveram redução da massa muscular e tamanho da fibra muscular dos músculos gastrocnêmio medial (GM) e tibial Anterior (TA) em um modelo de lesão nervosa periférica. Mudanças similares também foram descritas por Patterson e Stephenson (32) nos músculos esqueléticos sóleo e extensor longo dos dedos, em um modelo de desnervação isquiática de ratos *Long-Evans*.

A morfometria do presente estudo demonstrou diferenças do grupo controle em relação aos demais grupos para área das fibras do tipo IIa e IIb, não revelando diferenças entre os grupos tratados. Quanto à área das fibras do tipo I, não houve

diferença significativa entre os grupos. Isso demonstrando que a lesão nervosa produzida não afetou de maneira significativa a área das fibras do músculo plantar, diferentemente do observado em outros músculos (31,32), embora o grupo Ls tenha apresentado redução do diâmetro menor da fibra do tipo I e IIa em relação ao grupo tratado com sericina e exercício físico de natação (Ser+Nat).

Mira et al.(33) descrevem que, em torno do 10^o e 15^o dia após esmagamento do nervo isquiático, fibras nervosas regeneradas estão presentes no nervo. Isso demonstra que o sistema nervoso periférico possui alta capacidade de recuperação, conseqüentemente alterando de maneira benéfica e rápida seu órgão efector, acelerando o processo de reparo. A presente análise morfométrica fora realizada no 22^o PO, o que pode explicar a ausência de significância em relação à análise.

Na análise da massa muscular, Tanaka (16) descreve que não houve alteração do peso muscular do músculo sóleo, em um modelo de desnervação do nervo tibial de ratas Wistar. Resultados semelhantes foram descritos por Sanches (34) no músculo sóleo de ratos *Sprague Dawley*, em um modelo de neuropatia periférica.

Entretanto, o peso do músculo plantar no presente estudo apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao demais grupos, demonstrando que houve diminuição da massa muscular em consequência da LNP, confirmando que a atividade neuromuscular é determinante na manutenção das propriedades musculares. Quanto aos demais grupos, não houve registro de diferenças. Embora o peso muscular no grupo controle, tenha sido significativo estatisticamente em detrimento a todos os demais grupos que sofreram lesão. O parâmetro comprimento do músculo não foi alterado em nenhum dos grupos, demonstrando que, embora a lesão nervosa tenha provocado a redução do peso muscular, ela não foi intensa o bastante para produzir alterações longitudinais da musculatura.

Nesta pesquisa, a hipótese foi de que a proteína sericina, associada ao exercício de natação, poderia ser um fator importante na recuperação da parestesia. Todavia, ela não se concretizou, mesmo considerando as características da sericina na proliferação e divisão celular (19,21), bem como pela ação do exercício na redução da degradação protéica (35), hipertrofia muscular (14), possível analgesia mediada por opioides endógenos (que poderia reduzir o déficit funcional do membro) (36), bem como as propriedades da água, tais como: aumento da circulação periférica, melhora no aporte de oxigênio e nutrientes, aumento do retorno sanguíneo e linfático,

diminuição de edemas devido à ação da pressão hidrostática e à redução da sensibilidade dos terminais nervosos (37).

Os resultados deste estudo demonstram que, na primeira avaliação realizada pré-cirurgia, os animais apresentaram maior força quando comparados com os demais, portanto, pertinente com padrões de normalidade, não houve diferença entre as demais avaliações e grupos. A redução da força pode estar relacionada à hipernocicepção gerada pela compressão nervosa, que produz uma inibição muscular (38). Além disso, estudos revelaram que o tratamento com exercício físico de natação pode não ser capaz de reduzir o quadro algico de ratos submetidos à ciatalgia (39), bem como é capaz de produzir hiperalgesia nervosa (22), o que pode acarretar consequências aos órgãos efetores, como o músculo esquelético. No presente estudo, todos os grupos com lesão apresentaram redução significativa da força de preensão, independente se tratados ou não. De forma semelhante, Agbulut et al. (40) demonstraram que houve redução da força máxima, bem como outros parâmetros funcionais do músculo sóleo, em um modelo de desnervação do nervo isquiático, demonstrando que a integridade do nervo é necessária para manutenção da funcionalidade muscular.

A atividade contrátil do músculo esquelético é regulada pelo sistema nervoso central, por meio da transmissão de potenciais de ação advindo dos neurônios motores às fibras musculares. Tanto o axônio motor pré-sináptico quanto a fibra muscular esquelética pós-sináptica são altamente especializadas na JNM, garantindo assim uma transmissão eficiente do potencial de ação (9).

A preservação da JNM é importante para manter a massa muscular. Ela demonstra uma impressionante plasticidade quando submetida a alterações neuromusculares, mesmo em animais adultos, sendo que uma abrupta e completa paralisação da atividade neuromuscular por meio da desnervação ou lesão por neurotoxinas modulam sua estrutura e função (41). Elas estão sujeitas a remodelações, devido a diversos fatores: idade, desnervação, envelhecimento (7), tipo de fibra muscular, atividade e estado hormonal (12,42), algumas doenças congênitas, como Miastenia Graves e Síndrome de Lambert-Eaton, além de várias formas de intoxicação, sendo uma delas o botulismo (9).

Todavia, tanto a análise morfológica quanto a morfometria das JNMs mensuradas no presente estudo não apresentaram diferenças significativas. Pode-se

observar o polimorfismo das JNMs na análise morfológica, embora não houve diferença significativa para os parâmetros morfométricos da área, diâmetro maior e menor. Apesar da lesão nervosa ter sido caracterizada, ela não foi suficientemente capaz de alterar a morfologia das JNMs, provavelmente devido à capacidade regenerativa que o sistema nervoso periférico (SNP) possui, considerando o tempo decorrido de 22 dias pós-operatório, bem como a intensidade da LNP, que se caracteriza por ser uma lesão nervosa intermediária. Gorio et al.(43) apontam que 25% das fibras musculares já estão poli-inervadas em aproximadamente 15º dias após esmagamento do nervo isquiático de ratos, sendo que no 25º dia a atividade mecânica do músculo está parcialmente recuperada, e, a partir do 26º ao 60º dias, os contatos sinápticos excessivos são eliminados e a fibra torna-se mono-inervada e em 90º dias o tamanho da JNM já está recuperado.

Contudo, Torrejais et al. (11), analisando a morfometria e morfologia das JNMs de diafragmas de ratos novergicos desnervados em diferentes períodos, observaram que, após a desnervação, as JNMs se apresentaram menores e com aspecto alongado, com contornos menos visíveis. Alterações na morfometria da JNM também foram descritas por Liu et al. (44) em um modelo de desnervação do nervo tibial anterior de ratos Sprague-Dawley.

A inervação é fundamental para manter as propriedades e a plasticidade muscular dos diferentes tipos de fibras. Com a ausência do estímulo nervoso ocorre redução da isoforma lenta de cadeia pesada de miosina, com consequente aumento da cadeia pesada de miosina rápida (6).

Patterson e Stephenson (32) verificaram alterações no fenótipo da fibra muscular do músculo sóleo de ratos *Long-Evans*, com redução da isoforma lenta MHCI, ~77% para 61%, com concomitante aumento da isoforma rápida MHCIIA, de ~23% para 39%, bem como alterações na morfometria dos diferentes tipos de fibras em um modelo de lesão nervosa isquiática.

Resultados similares são descritos por Minamoto (6), em um modelo de desnervação do músculo sóleo. Foi observado que, 30 dias pós-lesão, a porcentagem de fibras rápidas do tipo IIb aumentou de 4% para 9%, bem como as fibras do tipo IIx, que aumentaram de 13% para 23%; em contrapartida, as fibras do tipo IIa e I diminuíram de 42% para 32% e 41% para 36%, respectivamente,

comprovando que a redução da atividade nervosa provoca remodelação na fibra no sentido de lenta para rápida.

Os resultados do presente estudo verificaram que a lesão nervosa alterou a isoforma de cadeia pesada de miosina, com redução da isoforma lenta, tendo em vista que o músculo plantar possui predominância fenotípica de cadeia pesada de miosina rápida (45). Tais resultados são corroborados pela literatura que demonstra que músculos fásicos, quando desnervados, tendem a se tornarem músculos tônicos (lentos) (31,32,34,46). A contagem das fibras musculares apresentou diferença significativa para as fibras do tipo I do grupo Ct em relação aos demais grupos, sendo que o grupo Ls também apresentou diferença significativa em relação ao grupo Ser, Nat e Ser+Nat, com redução no percentual das fibras em 28%, 31% e 29%, respectivamente, não havendo diferença entre os demais grupos estudados.

A inervação é fator determinante, tanto no desencadeamento quanto na manutenção do fenótipo contrátil (40), bem como sofre influência da desnervação e hormônios (47). Contudo, Agbulut et al. (40) relataram em sua pesquisa que o déficit de atividade neuromuscular não foi capaz de modular o fenótipo contrátil e que a manutenção da expressão relativa da cadeia pesada de miosina MHC lenta é independente da atividade neuromuscular no músculo sóleo de ratos, em um modelo de desnervação do nervo isquiático. Esse resultado diverge da literatura sobre a dependência nervosa em relação à modulação fenotípica, demonstrando que a modulação das propriedades contráteis do músculo esquelético varia de acordo com o tipo de músculo (lento ou rápido) analisado e o tipo de lesão nervosa empregada (6,31,32,40,48).

Embora o exercício físico afete o organismo como um todo, os principais impactos positivos são as adaptações que ocorrem no músculo esquelético (15). Assim como a desnervação, o exercício físico é capaz de provocar mudanças no fenótipo da fibra muscular, sendo que a função e demanda de trabalho imposta determina a expressão das isoformas (49). Especificamente, o exercício aeróbio promove transformação no tipo de fibra no sentido de rápido para lenta (tipo IIb/IIx para IIa) em músculos com padrões normais de inervação (15). Porém, o exercício físico de natação no presente estudo não foi capaz de promover transformação no fenótipo do músculo plantar. Presume-se que a lesão nervosa tenha suplantado a

capacidade do exercício físico de natação, bem como sua associação com a proteína sericina em transformar as propriedades contráteis do músculo.

Resultados similares também foram descritos por Tanaka (16) em um modelo de desnervação parcial do nervo tibial anterior. Verificou-se que o exercício aeróbio em esteira não foi eficiente para promover a transformação fenotípica no músculo sóleo de ratos Wistar. Kim et al. (50) também verificaram que o exercício aeróbio de escada durante oito semanas não foi capaz de mudar as proporções de cadeia pesada de miosina no músculo gastrocnêmio medial de ratos Zucker.

Neste estudo, a lesão nervosa do tipo axonotmese não foi suficiente para modificar a morfologia das JNMs, bem como alterar a funcionalidade músculo esquelética. A associação da proteína sericina ao exercício de natação na fase aguda não foi uma modalidade terapêutica eficaz para transformar as propriedades contráteis do músculo plantar, embora a lesão nervosa o tenha feito.

Sugere-se, diante desses resultados, novos estudos acerca da remodelação fenotípica que também parece ser modulada por proteínas específicas que são superexpressas durante o exercício físico, como por exemplo a proteína kinase D1 (PKD1) e Proliferador ativado Receptor- γ coativador-1 α (PGC1- α). A expressão aumentada de ambas conduz ao aumento do percentual de fibras de contração lenta (15). Embora o presente estudo não apresente análise molecular, a expressão protéica pode ter ocorrido.

É de extrema importância que profissionais da saúde entendam a íntima integração entre o sistema neuromotor e sua aplicabilidade clínica, sendo as condutas terapêuticas contemplativa de ambos, músculo e nervo, assim como as estruturas envolvidas na lesão nervosa, a fim de acelerar o processo regenerativo, visando ao retorno da funcionalidade ao paciente.

CONCLUSÃO

A associação da proteína sericina ao exercício físico de natação não se mostrou eficiente quanto a recuperação da força de preensão e alteração das propriedades contráteis do músculo, alteradas pela axonotmese experimental.

Agradecimentos:

Centro de Reabilitação Física (CRF) – Unioeste.

REFERÊNCIAS

1. Silva CK, Camargo EA. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas./ Mechanisms involved in the regeneration of peripheral nerve injuries. *Saúde e Pesquisa*. 2010;3(1):93–8.
2. Li R, Liu Z, Pan Y, Chen L, Zhang Z, Lu L. Peripheral nerve injuries treatment: A systematic review. *Cell Biochem Biophys*. 2014;68(3):449–54.
3. Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods*. 2015;243(1):39–46.
4. Kobayashi S, Yoshizawa H, Yamada S. Pathology of lumbar nerve root compression Part 2: Morphological and immunohistochemical changes of dorsal root ganglion. *J Orthop Res*. 2004;22(1):180–8.
5. Kääriäinen M, Kauhanen S. Skeletal muscle injury and repair: the effect of disuse and denervation on muscle and clinical relevance in pedicled and free muscle flaps. *J Reconstr Microsurg*. 2012;28(1):581–7.
6. Minamoto VB. Efeitos da desnervação no músculo esquelético. / Effect of denervation on skeletal muscle: a review. *Fisioter Mov*. 2007;20(3):63–9.
7. Gonzalez-freire M, Cabo R De, Studenski SA, Ferrucci L. The neuromuscular junction: aging at the crossroad between nerves and muscle. *Front Aging Neurosci*. 2014;6(208):1–11.
8. Wu H, Xiong WC, Mei L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development*. 2010;137(7):1017–33.
9. Kwon YN, Yoon SS. Sarcopenia: neurological point of view. *J Bone Metab*. 2017;24(2):83–9.
10. Russo TL, França CC, Castro ES, Salvini TF. Alterations of chronaxia, reobase and accommodation in denervated skeletal muscle submitted to electrostimulation. *Rev Bras Fisioter*. 2004;8(2):169–75.
11. Torrejais MM, Soares JC, Matheus SMM, Mello JM, Francia-Farje LAD, Vicente EJD. Morphometric and morphological analysis of neuromuscular junction alterations in the denervated rat diaphragm. *Int J Morphol*. 2009;27(4):1235–42.
12. Deschenes MR, Sherman EG, Roby MA, Glass EK, Harris B. Effect of resistance training on neuromuscular junctions of young and aged muscles featuring different recruitment patterns. *J Neurosci Res*. 2016;93(3):504–13.
13. Deschenes MR, Roby MA and GEK. Aging influences adaptations of the

- neuromuscular junction to endurance training. *neuroscience*. 2012;190(8):56–66.
14. Simionato LH, Henrique C, Bortoluci F, Yone M, Souza F De, Furtado MN, et al. **Comparacao do efeito do treinamento físico de natação com carga e sem carga na musculatura estriada esquelética de ratos. / Comparison of the effect of physical swimming training load and off load in the striated skeletal muscle of rats.** *Salusvita*. 2015;34(2):251–63.
 15. Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN, Lira VA, Lee CS, Georgiou DK, et al. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2011;110(1):264–74.
 16. Tanaka S, Tsubaki A, Tachino K. Effect of exercise training after partial denervation in rat soleus muscles. *J Phys Ther Sci*. 2005;17(2):97–101.
 17. Malysz T, Ilha J, Nascimento PS, Heuser MCF, Angelis K. Exercise training improves the soleus muscle morphology in experimental diabetic nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 2011;44(4):571–82.
 18. Rajput SK, Singh MK. Sericin – a unique biomaterial. *J Polym Text Eng*. 2015;2(3):29–35.
 19. Shin S, Yeon S, Park D, Oh J, Kang H, Kim S, et al. Silk amino acids improve physical stamina and male reproductive function of mice. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(2):273–8.
 20. Kim J, Hwang H, Yun H-Y, Kim B, Lee C-H, Suh H, et al. Silk Peptide intake increases fat oxidation at rest in exercised mice. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2013;59(3):250–5.
 21. Aramwit P, Palapinyo S. Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. *Arch Dermatol Res*. 2013;305(1):585–94.
 22. Bertolini GRF, Merigo C, Artifon EL, Cunha DM, Meireles A. Swimming training on the functional evaluation of sciatic nociception in rats. *Rev Bras Reumatol*. 2011;51(3):249–59.
 23. Bertelli JA, Mira JC. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Methods*. 1995;58(1–2):151–5.
 24. Coradini J, Kakihata CMM, Kunz RI, Errero TK, Bonfleur ML, Bertolini GRF. Evaluation of grip strength in Wistar rats, normal and obese, submitted to

- swimming with overload after median nerve compression. *Rev Bras Reumatol.* 2014;5(1):43–7.
25. Lehrer GM, Ornstein L, Lehrer BGM, Ornstein L, Ph D. A Diazo Coupling Method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *J Biophysiological Biochem.* 1959;6(3):399–406.
 26. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch Neurol.* 1970;23(1):369–79.
 27. Moline SW, Glenner GG. Ultrarapid tissue freezing in liquid nitrogen. *J Histochem Cytochem.* 1964;12(10):777–83.
 28. Câmara CNDS, Brito MVH, Silveira EL, Silva DSG, Simões VRF, Pontes RWF. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. *Acta Cirúrgica Bras.* 2011;26(1):12–8.
 29. Cavalcante EV, Silva LG, Montenegro EJ, Filho NT. Effect of electrostimulation on the denervated muscle of animals: systematic review. *Fisioter Mov.* 2012;25(3):669–78.
 30. Salvini T de F, Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL. Effects of electrostimulation and muscle stretching on denervated muscle adaptation - implications for physical therapy. *Brazilian J Phys Ther.* 2012;16(3):175–83.
 31. Zhong H, Roy RR, Woo J, Kim JA, Edgerton VR. Differential modulation of myosin heavy chain phenotype in an inactive extensor and flexor muscle of adult rats. *J Anat.* 2007;210(1):19–31.
 32. Patterson MF, Stephenson GMM, Stephenson DG. Denervation produces different single fiber phenotypes in fast- and slow-twitch hindlimb muscles of the rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(1):518–29.
 33. Mira JC. Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regenerating fibres after repeated localized freezings. *J Anat.* 1979;129(1):77–93.
 34. Sanches L, Serfass M, Thompson L. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain isoform expression in diabetic rats with peripheral neuropathy. *Am J Phys Med Rehabil.* 2005;84(10):770–9.
 35. Lee Y, Kim J, Hong Y, Lee S. Prophylactic effects of swimming exercise on autophagy-induced muscle atrophy in diabetic rats. *Lab Anim Res.* 2012;28(3):171–9.

36. Bertolini GRF, Rosa CT, Silva LI, Meireles A, Rocha BP. Use of naloxone antagonized resistance exercise as analgesia factor in acute Wistar rat knee synovitis. *Rev Bras Med Esporte*. 2012;18(2):126–9.
37. Medeiros A, Oliveira EM. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Brazilian J Med Biol Reserach*. 2004;37(1):1909–17.
38. Yahia A, Ghroubi S, Kharrat O, Jribi S, Elleuch M, Elleuch MH. A study of isokinetic trunk and knee muscle strength in patients with chronic sciatica. *Ann Phys Rehabil Med*. 2010;53(4):239–49.
39. Gaffuri J, Meireles A, Rocha BP, Rosa C thieime, Silva LI, Moreira NB, et al. Evaluation of physical exercise as analgesia factor in an experimental model of sciatica. *Rev Bras Med Esporte*. 2011;17(8):115–8.
40. Agbulut O, Vignaud A, Hourde C, Mouisel E, Fougerousse F, Ferry A, et al. Slow myosin heavy chain expression in the absence of muscle activity. *J Physiol Cell Physiol*. 2009;296(1):205–2014.
41. Deschenes MR, Wilson MH. Age-related differences in synaptic plasticity following muscle unloading. *J Neurobiol*. 2003;57(3):246–56.
42. Fahim MA. Endurance exercise modulates neuromuscular junction of C57BL/6NNia aging mice. *J Appl Physiol*. 1997;83(1):59–66.
43. Gorio A, Carmignoto G, Finesso M, Polatto P, Nunzi MG. Muscle reinnervation - II. Sprouting, synapse formation and repression. *Neuroscience*. 1983;8(3):403–16.
44. Liu L, Xie F, Wei K, Hao X. Sepsis induced denervation-like changes at the neuromuscular junction. *J Surg Res*. 2016;200(2):523–32.
45. Chaillou T, Koulmann N, Meunier A, Malgoyre A, Serrurier B, Beaudry M. Effect of hypoxia exposure on the phenotypic adaptation in remodelling skeletal muscle submitted to functional overload. *Acta Physiol*. 2013;209(1):272–82.
46. Rowan SL, Rygiel K, Purves-smith FM, Solbak NM, Douglas M, Hepple RT. Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. *PLoS One*. 2012;7(1): e29082. doi: 10.1371/journal.pone.0029082.
47. Flück M. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J Exp Biol*. 2006;209(12):2239–48.

48. Chai RJ, Vukovic J, Dunlop S, Grounds MD, Shavlakadze T. Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle. *PLoS One.* 2011;6(12): e28090. doi: 10.1371/journal.pone.0028090
49. Bicudo JEPW. Atividade física e plasticidade da musculatura esquelética. / Physical activity and plasticity of the skeletal musculature. *Rev Biol.* 2013;11(1):1–7.
50. Kim J, Choi MJ, So B, Kim H, Seong JK, Song W. The preventive effects of 8 weeks of resistance training on glucose tolerance and muscle fiber type composition in zucker rats. *Diabetes Metab J.* 2015;39(1):424–33.

Tabela 1 – Valores da força de preensão plantar de ratos *Wistar* em gramas, para os diferentes momentos de avaliação (AV1 a AV8), nos diferentes grupos.

Avaliações	Ct ^A	Ls ^B	Ser ^B	Nat ^B	Ser+Nat ^B
AV1^a	197,12±151,8	239,77±100,7	187,08±107,1	208,19±60,3	288,66±183,4
AV2^b	257,79±92,56	0,89±0,65	1,33±0,61	0,90±0,73	1,14±0,87
AV3^b	266,79±118,01	1,22±0,95	1,0±0,87	1,04±0,89	1,04±0,48
AV4^b	199,50±142,01	0,72±0,61	0,78±0,42	0,52±0,46	0,62±0,67
AV5^b	253,41±106,35	1,22±0,71	0,99±1,06	0,38±0,40	0,81±0,60
AV6^b	266,62±242,88	1,22±1,04	0,91±0,23	1,76±1,98	2,38±3,48
AV7^b	216,29±134,50	1,11±1,00	1,29±1,55	6,76±9,53	1,57±1,88
AV8^b	253,29±90,84	9,11±20,21	4,54±6,41	6,47±4,43	3,52±3,81

Letras Diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos. Valores expressos em média ± desvio padrão. Pós teste *Bonferroni*. Letras maiúsculas representam diferenças entre os grupos e minúsculas entre as avaliações.

Tabela 2 – Valores dos parâmetros peso e comprimento do músculo plantar nos diferentes grupos.

Parâmetros	Ct	Ls	Ser	Nat	Ser+Nat
Peso muscular (g)	0,53±0,18 ^a	0,26±0,10 ^b	0,29±0,09 ^b	0,26±0,08 ^b	0,22±0,10 ^b
Comprimento (mm)	2,79±0,52 ^a	2,74±0,47 ^a	2,55±0,34 ^a	2,58±0,47 ^a	2,66±0,51 ^a

Letras Diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos. Valores expressos através da média ± desvio padrão. Pós teste *t Student*. Representa p < 0,002.

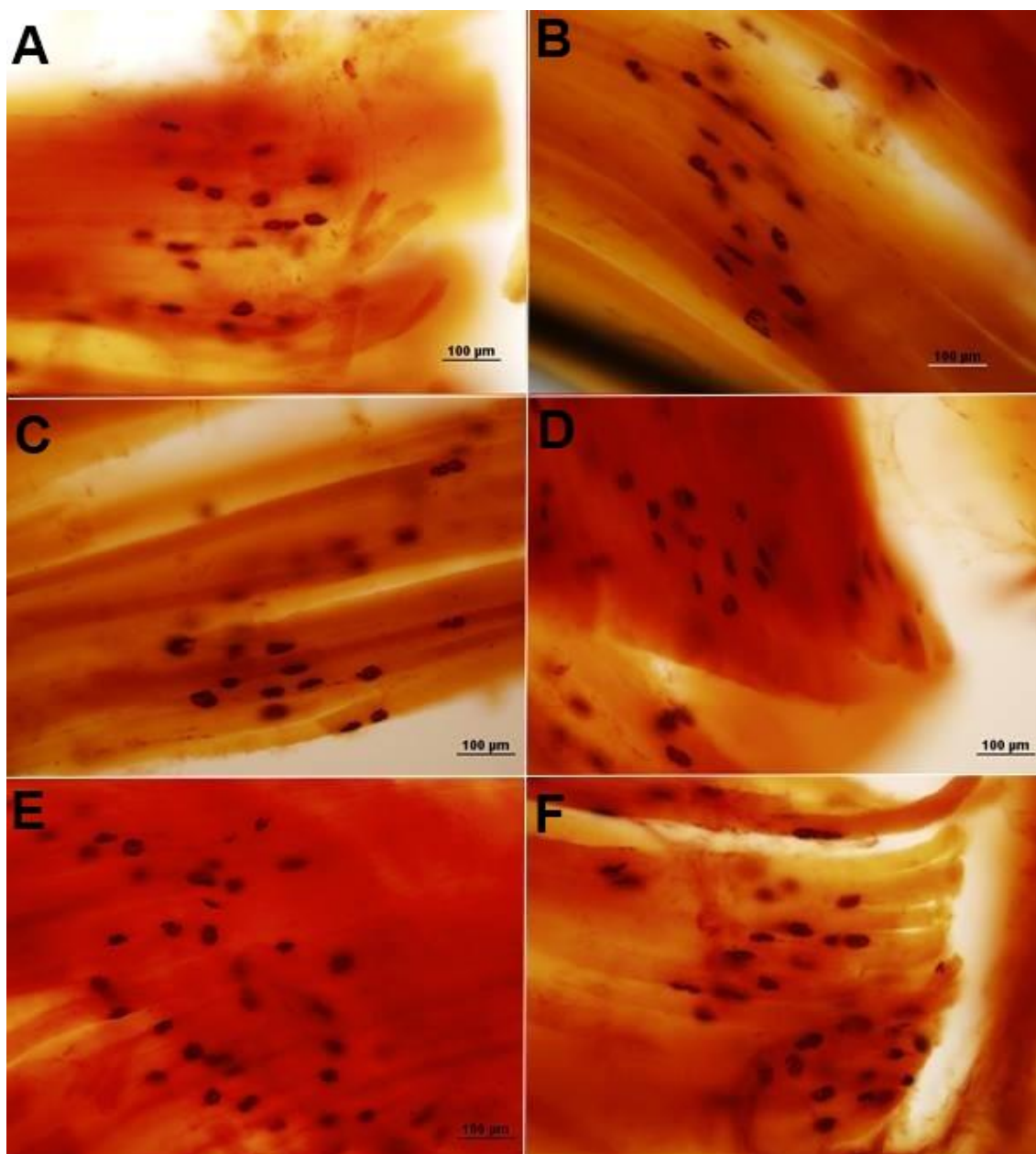


Figura 1 – Fotomicrografias das JNMs observadas no músculo plantar de ratos *Wistar*, referentes ao 22º PO. Secção longitudinal, Esterase Inespecífica, Grupos: Ct, **A**, Ls, **B** Ser, **C**, Nat, **D**, Ser+Nat, **E** e **F**. Observar o polimorfismo das JNMs.

Tabela 3 – A morfometria das JNMs do músculo plantar de ratos *Wistar*, nos animais dos grupos (Ct,Ls,Ser,Nat e Ser+Nat), para as diferentes variáveis.

Parâmetros	Ct	Ls	Ser	Nat	Ser+Nat
Área	645,61±124,5 ^a	618,75±114,1 ^a	627,06±81,38 ^a	553,82±115,7 ^a	530,31±103,5 ^a
Diâmetro maior	42,62±2,37 ^a	43,42±5,12 ^a	41,44±3,63 ^a	40,12±6,01 ^a	39,13±6,37 ^a
Diâmetro menor	18,37±3,55 ^a	18,44±2,38 ^a	18,29±1,56 ^a	16,50±1,82 ^a	16,59±1,34 ^a

Letras Diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos. Valores expressos através da média ± desvio padrão. Pós teste *t Student*. Representa $p > 0,05$.

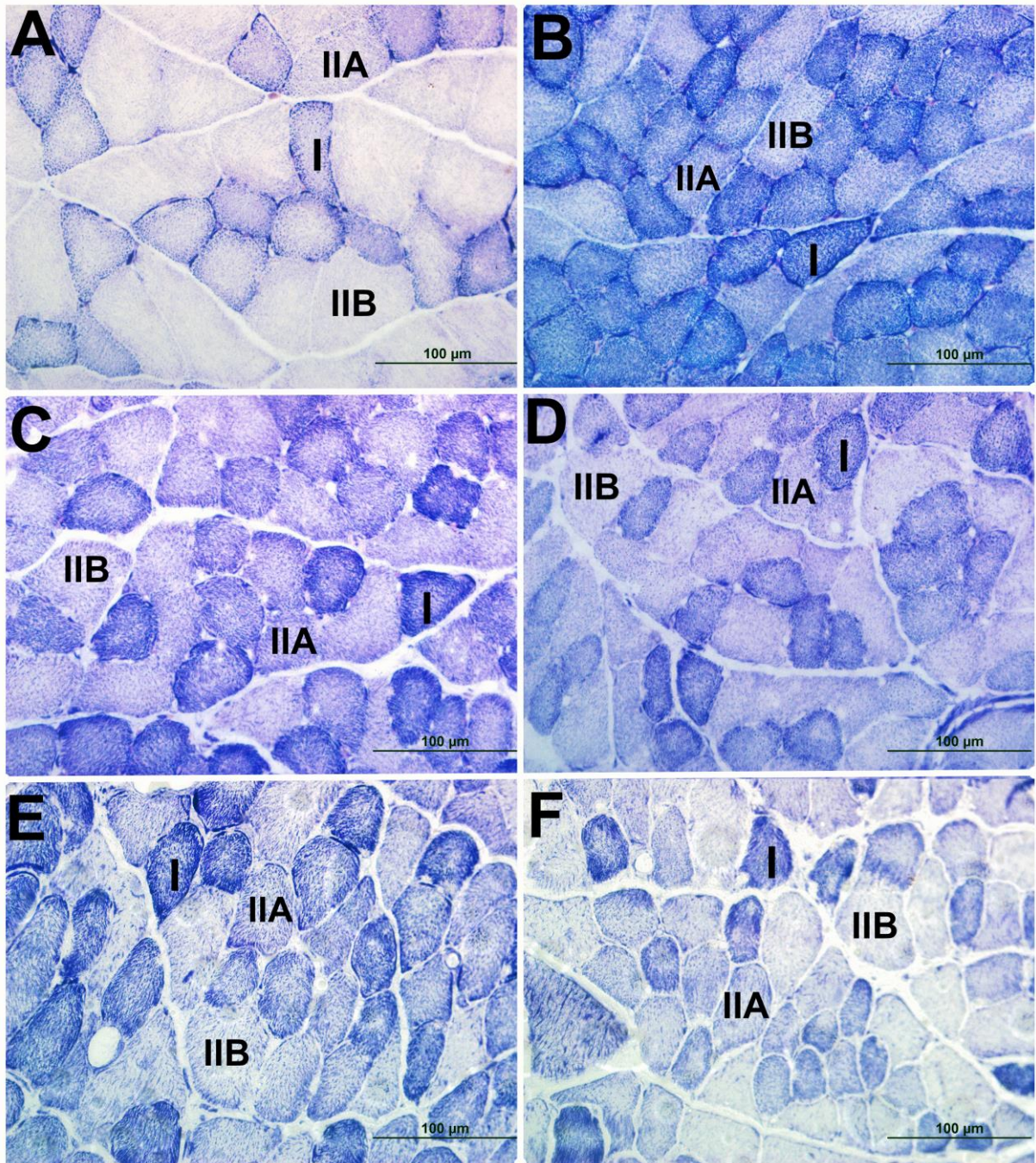


Figura 2 – Fotomicrografias do músculo plantar de ratos *Wistar*, 22^o PO. Secção transversal, reação de NADH-TR. Fibras musculares dos tipos I, IIA e IIB. Grupos: Ct **A**, Ls **B**, Ser **C**, Nat **D**, Ser+Nat **E** e **F**.

Tabela 5 - Contagem dos diferentes tipos de fibras musculares, I, Ila e IIB, do músculo plantar de ratos Wistar, 22^oPO.

Parâmetros	Ct	Ls	Ser	Nat	Ser+Nat
Fibra Tipo I	92,20±11,60 ^{abc}	105,50±41,34 ^{bc}	147,20±30,86 ^c	154,40±17,15 ^c	149,20±16,81 ^c
Fibra tipo IIA	61,60±8,26 ^a	65,75±27,58 ^a	70,40±16,36 ^a	61,40±15,72 ^a	60,60±11,21 ^a
Fibra tipo IIB	73,0±13,19 ^a	63,25±16,15 ^a	74,60±12,21 ^a	57,40±16,08 ^a	69,80±7,94 ^a

Letras Diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos. Valores expressos através da média ± desvio padrão. Pós teste *t Student*. Representa p <0,05.

Tabela 4 - Valores encontrados para área dos diferentes tipos de fibras musculares, I, Ila e IIB, do músculo plantar de ratos Wistar, 22^oPO.

Parâmetros	Ct	Ls	Ser	Nat	Ser+Nat
Fibra Tipo I	1641,6±221,4 ^a	1237,1±447,3 ^a	1173,4±137,7 ^a	1288,0±270,0 ^a	1302,6±210,9 ^a
Fibra tipo IIA	2313,2±327,6 ^a	1392,1±389,3 ^b	1563,6±328,3 ^b	1411,4±288,2 ^b	1509,9±345,3 ^b
Fibra tipo IIB	3449,0±498,0 ^a	1842,9±501,0 ^b	1679,7±283,8 ^b	1727,3±248,3 ^b	1944,0±126,4 ^b

Letras Diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos. Valores expressos através da média ± desvio padrão. Pós teste *t Student*. Representa p <0,05.

Tabela 6 –Valores encontrados para análise morfométrica do diâmetro menor das fibras musculares tipo I, Ila e IIB, do músculo plantar de ratos Wistar, 22^oPO.

Diâmetro menor	Ct	Ls	Ser	Nat	Ser+Nat
Fibras I	35,85±2,28 ^a	32,57±5,98 ^{ab}	30,22±1,37 ^{bc}	31,64±1,97 ^{bcd}	23,71±2,41
Fibras IIA	45,30±0,80 ^a	34,07±4,63 ^b	32,71±2,57 ^{bc}	33,61±3,15 ^{bcd}	27,41±2,69
Fibras IIB	51,93±4,37 ^a	39,0±4,47 ^b	36,67±5,38 ^b	39,22±4,02 ^b	34,25±3,89 ^b

Letras Diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos. Valores expressos através da média ± desvio padrão. Pós teste *t Student*. Representa p <0,05.

ANEXO A



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

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

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

ANEXO B

Instituto de pesquisa israelista Albert Einstein recebe artigos artigos da seguinte forma e categoria:

Instruções aos autores

Escopo e política

Os artigos originais podem ser enviados em português e / ou inglês. Após a aprovação pelos editores, todos os artigos são encaminhados para análise e avaliação por pelo menos dois revisores, e o anonimato é assegurado durante todo o processo de submissão. Os comentários são enviados aos autores, para que eles possam modificar o texto ou dar motivos para não alterá-lo. Depois de fazer as correções sugeridas pelos revisores, o artigo definido deve ser enviado à revista einstein (São Paulo) através do Sistema de Gerenciamento da revista, em <http://apps.einstein.br/revista>. Os artigos são enviados para publicação apenas após a aprovação final dos revisores e editores.

Os autores são os únicos responsáveis pelos conceitos fornecidos nos artigos. Os artigos aceitos para publicação se tornam propriedade do jornal. Somente o editor de einstein (São Paulo) pode autorizar a reprodução de artigos em outra revista.

O conteúdo da einstein (São Paulo) é licenciado pela Creative Commons (CC BY) Atribuição internacional 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

O periódico adota o sistema de Turnitin para identificar o plágio. Os casos de má conduta na publicação serão considerados de acordo com os critérios e recomendações do Comitê de Ética da Publicação (COPE; <http://publicationethics.org>).

Einstein (São Paulo) é um jornal de acesso aberto, e não há cobrança por submissão, revisão, tradução e publicação de artigos.

Todos os processos são conduzidos eletronicamente e podem ser acessados em <http://apps.einstein.br/revista>.

Forma e preparação de manuscritos

A revista einstein (São Paulo) tem as seguintes seções: Artigo Original, Economia e Gestão da Saúde, Relatório de Caso, Revisão, Revisão de Ciências Básicas, Aprendizado por Imagens, Desenvolvimentos Médicos e Letras ao Editor. A revista também publica uma subseção de revisões temáticas.

Artigo original - Projetado para relatar os resultados da pesquisa científica. O artigo deve ser original e não publicado e conter os seguintes itens: resumo estruturado (em português e inglês para artigos apresentados em português e em inglês para aqueles apresentados em inglês), introdução, objetivo, métodos, resultados, discussão, conclusão e referências. Os artigos originais devem ter no máximo 3.000 palavras e 30 referências.

Economia e gestão da saúde - Artigos concebidos para denunciar o conhecimento, que expressam conceitos e refletem sobre práticas efetivas em gestão, administração e economia da saúde. Os seguintes itens devem ser incluídos: resumo estruturado (em português e inglês para artigos apresentados em português e em inglês para aqueles apresentados em inglês), introdução, objetivo, métodos, resultados, discussão, conclusão e referências. Eles devem ter no máximo 3.000 palavras e 30 referências.

Relatório de caso - Relatórios de casos de uma determinada condição médica, particularmente situações raras com dados relevantes ao leitor, descrevendo seus aspectos, história, gerenciamento, etc., incluindo uma breve revisão da literatura, descrição do caso e discussão relevante. Eles devem ter no máximo 1.000 palavras e até 10 referências.

Revisão - Os artigos de revisão podem ser narrativas e / ou revisões sistemáticas, incluindo avaliações críticas da literatura sobre um determinado assunto; Eles devem descrever os procedimentos utilizados, o tópico e seus limites, conclusões e referências. O texto deve ter no máximo 3.000 palavras e até 40 referências. Todas as revisões só podem ser enviadas mediante convite do editor.

Revisando ciências básicas - Revisar artigos sobre temas básicos de ciência com impacto clínico relevante. Eles devem ter no máximo 2.000 palavras e 30 referências.

Aprendizado por imagens - Uma imagem patognomônica típica - ultra-som, tomografia computadorizada, raios-X, ressonância magnética, fotografia de cirurgia, microscopia ou sinal clínico - seguido de um texto explicativo com no máximo 300 palavras e 10 referências.

Desenvolvimentos médicos - Seção projetada para publicação de novidades diagnósticas e / ou terapêuticas atualmente aplicadas em diferentes áreas de saúde. Discute os desenvolvimentos que já estão em uso. Os autores são livres para escrever o texto, que deve ter no máximo 1.000 palavras e 10 referências.

Cartas para o editor - O objetivo é comentar ou discutir artigos publicados na revista, ou para relatar pesquisas originais em andamento, descobertas científicas, etc. Deve ter no máximo 150 palavras e 5 referências. As cartas ao Editor não passarão pela revisão pelos pares e serão publicadas após a avaliação dos Editores.

Requerimentos técnicos

Os autores devem enviar os artigos que contenham:

- Texto digitado em fonte Arial de 12 pontos de espaçamento duplo e margem de 2,5 cm em cada lado, destacando cada seção do artigo.
- Permissão para reprodução de material e transferência de formulário de direitos autorais (disponível no sistema de envio eletrônico).

- Declaração dos autores de que o manuscrito não está sendo apreciado e não será submetido à publicação, em outro periódico (disponível no site eletrônico).

Preparando um manuscrito

- **Título:** título do artigo, em português e inglês, que deve ser conciso, mas informativo.
- **Resumo:** Resumo, em português e inglês, com um máximo de 250 palavras. Para os artigos originais, os resumos devem ser estruturados (Objetivo, Métodos, Resultados, Conclusão), descrevendo as principais partes do trabalho e destacando os dados mais relevantes. Para artigos de outras seções, o resumo não deve ser estruturado.
- **Palavras-chave:** especifique pelo menos 5 e no máximo 10 palavras-chave, em português e inglês, que refletem o conteúdo do documento. As palavras-chave devem ser baseadas nos Descritores de Ciências da Saúde (DeCS), publicado pela Bireme, e traduzido das Seções de Assunto Médico (MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina e disponível em: <http://decs.bvs.br>.
- Registro em banco de dados de ensaios clínicos: indique, para ensaios clínicos, o número de registro no banco de dados de ensaios clínicos (<https://clinicaltrials.gov>).
- **Texto:** deve cumprir a estrutura necessária para cada categoria de artigo. As citações dos autores no texto devem ser numeradas sequencialmente, por números árabes sobrescritos entre parênteses, em todas as categorias de artigos. Os termos completos para os quais as abreviaturas e as siglas indicam devem preceder a sua primeira utilização no texto. Não use abreviaturas ou siglas no título e no resumo. Nas legendas de tabela e figura, as abreviaturas devem ser seguidas pelo termo completo.
- **Agradecimentos:** descrevem a colaboração de indivíduos que merecem reconhecimento, mas não justificam a autoria. Inclua agradecimentos para apoio financeiro e / ou técnico, etc.

- **Referências:** devem ser numeradas consecutivamente na mesma ordem em que aparecem no texto e identificadas por algarismos arábicos. As referências seguem o "Estilo de Vancouver", e os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela Lista de Revistas Indexadas no Index Medicus, da Biblioteca Nacional de Medicina, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>. Para qualquer referência, mencione até seis autores. No caso de mais de seis autores, mencione os seis primeiros, seguidos por et al.
- **Tabelas:** todas as tabelas (máximo de quatro tabelas) devem conter o título e o título das colunas e devem ser mencionadas no texto. Eles devem ser numerados sequencialmente por algarismos árabes, na ordem em que aparecem no texto. As notas de rodapé da tabela devem ter uma chave para abreviaturas e testes estatísticos utilizados.
- **Figuras:** quaisquer figuras (imagens, gráficos, fotografias e ilustrações) devem ser mencionadas no texto e enviadas em maior ou igual tamanho de exibição pretendido. A revista aceita um máximo de quatro por artigo. Eles devem ser numerados sequencialmente por algarismos árabes, na ordem em que aparecem no texto. Se os números já foram publicados, uma autorização escrita para reprodução deve ser fornecida pelo autor / editor, e as legendas devem incluir a fonte de publicação.

Apresentação de manuscritos

Os artigos devem ser enviados para a revista einstein (São Paulo) em <http://apps.einstein.br/revista>. Todos os autores devem se registrar na plataforma ORCID em <https://orcid.org/signin>.

Einstein (São Paulo) é um jornal de acesso aberto, e não há cobrança por submissão, revisão, tradução e publicação de artigos.

Manuscrtos para submissão ao Journal of Exercise Rehabilitation devem ser preparados de acordo com as seguintes instruções:

Instructions for Authors

Characteristics and categories of manuscripts

Contents and Classifications of Manuscript

Journal of Exercise Rehabilitation is the official journal of the Korean Society of Exercise Rehabilitation, being published six times a year. Its formal abbreviation is "J Exerc Rehabil". The types of manuscripts include research articles, review articles, and articles invited by the Editorial Board. Journal of Exercise Rehabilitation contains 6 sections: Basic research on exercise rehabilitation, Clinical research on exercise rehabilitation, Exercise rehabilitation pedagogy, Exercise rehabilitation education, Exercise rehabilitation psychology, and Exercise rehabilitation welfare.

Only articles that are scientifically identified and theoretically, originally developed as the results of new, significant, and recent studying on the medical information and knowledge associated with the above-mentioned fields and that were conducted ethically and complied with policies of management of the Korean Society of Exercise Rehabilitation can be published in this Journal. Articles that have been already published or submitted for publication elsewhere cannot be submitted to this journal, and articles that have been published in this journal cannot be published elsewhere without permission. The Korean Society of Exercise Rehabilitation has all the copyrights of all the manuscripts that have been submitted and permitted for publication in this Journal.

Author Contributions

Authors are required to make clear of their contribution to their manuscript in cover letter. To be listed as an author one should have contributed substantially to all three categories established by the International Committee of Medical Journal Editors

(ICMJE): 1) conception and design, or acquisition, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published (www.icmje.org/index.html). The ICMJE further states that acquisition of funding, the collection of data, or general supervision of the research group, by themselves, do not justify authorship. Individuals who have contributed substantially to some but not all of the three categories, or in other areas, should be listed in Acknowledgments. In principle, we do not allow the addition of authors or the changes of the first or the corresponding author after our initial decision to accept the manuscript for publication. Written causes of changing should be submitted when the authors of a manuscript is changed, approval of the Editorial board is needed when the first author or corresponding author is changed, and approval of the Chief Editor is needed when other authors is changed before acceptance of the submitted manuscript. If an author wishes to be removed from the byline, he or she should submit a signed letter indicating his or her wish to be deleted from the list of authors. The change in the order in the byline requires a letter from all authors indicating agreement with the same.

Language

This Journal will accept manuscripts written in English only. The abstract should be written in English and English medical terms are based on International Continence Society (ICS) terminology, the recent edition as the report of Standardization Subcommittee of the ICS. Other terms are based on English-Korean Korean-English Medical Terminology, published by the Korean Medical Association.

Regulations on Ethics

The Journal adheres to the ethical guidelines for research and publication described in Good

Publication Practice Guidelines for Medical Journals (http://kamje.or.kr/publishing_ethics.html) and Guidelines on Good Publication (<http://publicationethics.org/static/1999/1999pdf13.pdf>).

Registration of Clinical Trial Research

Any research that deals with a clinical trial should be registered with a primary national clinical trial registration site such as <http://ncrc.cdc.go.kr/cris>, or other sites accredited by WHO or the International Committee of Medical Journal Editors.

Disclosure of Conflict of Interest

Conflict-of-Interest Statement

A conflict of interest may exist when an author (or the author's institution or employer) has financial or personal relationships or affiliations that could bias the author's decisions of the manuscript. Authors are expected to provide detailed information about all relevant financial interests and relationships or financial conflicts, particularly those present at the time the research was conducted and through publication, as well as other financial interests (such as patent applications in preparation), that represent potential future financial gain. All disclosures of any potential conflicts of interest, including specific financial interests and relationships and affiliations (other than those affiliations listed in the title page of the manuscript) relevant to the subject of their manuscript will be disclosed by the corresponding author on behalf of each coauthor, if any, as part of the submission process. Likewise, authors without conflicts of interest will be requested to state so as part of the submission process. If authors are uncertain about what constitutes a relevant financial interest or relationship, they should contact the editorial office. Failure to include this information in the manuscript will prohibit commencement of the review process of the manuscript. For all accepted manuscripts, each author's disclosures of conflicts of interest and relevant financial interests and affiliations and declarations of no such interests will be published. The policy requesting disclosure of conflicts of interest applies for all manuscript submissions. If an author's disclosure of potential conflicts of interest is determined to be inaccurate or incomplete after publication, a correction will be published to rectify the original

published disclosure statement. Authors are also required to report detailed information regarding all financial and material support for the research and work, including but not limited to grant support, funding sources, and provision of equipment and supplies as part of the submission process. For all accepted manuscripts, each author's source of funding will be published.

Funding/Support and Role of Sponsor

All financial and material support for the research and work will be requested to be clearly and completely identified as part of the submission process (Cover Letter). The specific role of the funding organization or sponsor in each of the following should be specified: "design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; and preparation, review, or approval of the manuscript." The corresponding author is responsible for acknowledging this on the authorship form at the time of submission.

Examination on Ethics

Personal information with which a patient's identity can be established cannot be published with any forms including texts, photos, and pedigree. When personal information of patients is critical as scientific data, it should be stated clearly that the purpose of the study and mental & physical damages that can be done during the participation to the study were sufficiently explained for and written contents were submitted by the participants or their caregivers. In a study of an experiment for human subjects, it should be reported that the experiment complied with the ethics criteria of institutions reviewing ethics of experiment on human body or local "Ethics Committee on Clinical Experiments" and Declaration of Helsinki. The data for explanation such as photos should not include names, English initials, and hospital numbers of patients. In cases of animal experiments, it should be stated clearly that the processes complied with regulations of institutions or national research committee related to breeding and using laboratory animals or the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. If necessary, it can be required to submit written consents and approvals of ethics committee.

Originality and Duplicate Publication

Manuscripts that have been already published elsewhere or in this journal should not be published. When a similar article has been already elsewhere or in this journal, its copy should be submitted with the relevant manuscript. The editorial Board of the Korean Society of Exercise Rehabilitation will decide whether the relevant manuscript is duplicately published and examine whether it can be published in this Journal.

MANUSCRIPTS PREPARATION

Review Articles

Review article was selected as a significant theme from areas relevant to neurologic field and whose authors were selected and referred on the basis of articles published in this or other journals. The submitted manuscript should be decided to be published via reviewing of the Editorial Board. The length of the manuscript should not exceed 5,000 words except for the cover, tables, figures, and references. The works in the references should not exceed 100.

Research Articles

The manuscript for original articles should be organized in the following order: 1) title page, 2) abstract and keywords, 3) introduction, 4) materials and methods, 5) results, 6) discussion, 7) conflict of interest, 8) acknowledgments (if necessary), 9) references, 10) tables, 11) figures and photos, and 12) legends. The manuscript should be provided in MS Word file (doc), double spaced on 212 x 297 mm (A4 size) with 2.5 cm margins at the top, bottom, and left margin.

The length of the manuscript should not exceed 5,000 words except for the cover, tables, figures, and references. No more than 50 references can be cited. All manuscript pages are to be numbered consecutively, beginning with the title page as page

1. The use of acronyms and abbreviations is discouraged and should be kept to a minimum. When used, they are to be defined where first used, followed by the acronym or abbreviation in parentheses. Abbreviations are not allowed in the title. The names and locations (city, state, nation) of manufacturers of equipment and non-generic drugs

should be given. When quoting from other sources, give a reference number in bracket after the author's name or at the end of the quotation.

Editorials

Editorials are invited perspectives on an area of exercise or rehabilitation, dealing with fields of research, current medical interests, fresh insights and debates.

GENERAL GUIDELINES FOR MANUSCRIPTS

Title Page

The title page should include the article title, name(s) of author(s), and institutional affiliations in English, and corresponding author and other footnotes. The author(s) should type the original and running title (less than 60 characters) in the title page directly. When there are several authors with different affiliations, the main institute should be recorded first and others be expressed as superscripts like 1, 2, 3, etc. next to the name of the relevant author and then the name of the affiliation in order. The corresponding author should present the name, affiliation, address, zip code, and contact details (such as Tel, Fax, and E-mail).

Abstract and Keywords

The abstract should be brief descriptions of the manuscript, containing 250 words. The abstract should be a structured one which includes purpose, methods, results, and conclusions. A list of keywords, with a maximum of six items in English, should be included at the end of the abstract. The selection of keywords should be based on Medical Subject Heading (MeSH) of Index Medicus, and each keywords should begin with a capital letter. Do not use abbreviations or reference citations.

Introduction

The introduction should address the purpose of the study briefly and concisely, and include background reports only related to the purpose of the study.

Materials and Methods

The design, subjects, and methods should be described in order. When patients are the subjects, the properties, inclusion criteria, and exclusion criteria of the populations should be clarified. Particular chemicals or equipment should be clarified of the names of the suppliers, the cities, the states, and the nations according to unified forms. Explanation of the experimental methods should be sufficient for repetition by other researchers, though methods that had been reported in detail may be described briefly by citation of references. However, new methods or modifications of previously published methods should be described enough for other researchers to represent. The methods of statistical verification on the results should be clarified.

Results

The authors should describe clearly and logically their significant findings of observations or results corresponding to the purpose of the study, following the order in the methods. The authors should avoid overlapping descriptions by figures or tables and by main text, describing important results only.

It should be clear which statistical test is associated with each Pvalue reported. Rarely used statistical techniques should be described. Medians and percentiles (such as quartiles) are preferred over means and standard deviations (or standard errors) when analyzing asymmetric data, especially when nonparametric statistics are calculated. Fractions (e.g., 5/10) should accompany percentages. In randomized clinical trials, consider reporting separate analyses with confounding variables included. If sample sizes differ between groups when patients are randomized, randomized, reasons should be provided.

Discussion

Important or new findings from the results of the study should be emphasized and the consequent conclusions are described, while repetition of the contents in the introduction and the results should be avoided. The authors are needed to describe the significance and limitations of the study and directions for the further studies, comparing with the results of the other related studies. Conclusion should be included in the discussion part. The conclusions should include a comprehensive description of

the judgment or thoughts of the authors being induced from the results and discussion sections and corresponding to the purpose of the study mentioned in the introduction. The simple summary or overlapped array of the results should be avoided. An addition of directions for further studies or expected effects should be avoided if possible.

Conflict of Interest

The corresponding author of an article is asked to inform the Editor of the authors' potential conflicts of interest possibly influencing their interpretation of data. A potential conflict of interest should be disclosed in the manuscript even when the authors are confident that their judgments have not been influenced in preparing the manuscript. Such conflicts may be financial support or private connections to pharmaceutical companies, political pressure from interest groups, or academic problems (e.g., employment/ affiliation, grants or funding, consultancies, stock ownership or options, royalties, or patents filed, received, or pending).

Acknowledgments

When necessary, acknowledgments shall be provided for those who contributed to the studying but were insufficient to be considered authors. The acknowledgments should express appreciation for the concrete roles of the contributors in the studying (e.g., data collection, financial assistance, statistical processing, and experimental analysis), and the authors should notify them that their names will be included in the acknowledgements for their advanced consents.

References

Abbreviations for the literature shall be based on the Index Medicus (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>). All authors are listed in the reference list. The description of the journal reference follows the below description. For more on references, refer to the "Citing Medicine: the NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers (<http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>)."

Journal Article:

Ferro JM. Update on intracerebral haemorrhage. *J Neurol* 2006; 253:985-999.

Kramer AF, Erickson KI. Capitalizing on cortical plasticity: influence of physical activity on cognition and brain function. *Trends Cogn Sci* 2007;11:342-348.

Kim BK, Shin MS, Lee HH, Sung YH, Kim H. Swimming alleviates streptozotocin-induced short-term memory impairment in rats. *J Exer Rehabil* 2012;8:273-284.

Guise AI, Chen F, Zhang G, See W. The effects of physiological estrogen concentration on the immune response of urothelial carcinoma cells to bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 2010 Nov 13 [Epub]. DOI: S0022-5347(10)04540-4.

Book:

Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. *Campbell-Walsh urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2007.

Book Chapter:

Klein Ea, Platz EA, Thompson IM. Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. *Campbell-Walsh urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 2854-73.

Website:

Whitmore K. Sexual pain in men and women with IC/PBS and chronic pelvic pain [Internet]. Bristol: International Continence Society; c2010 [cited 2010 Dec 20]. Available from: <https://www.icsoffice.org/News.aspx?NewsID=22>.

Tables

Tables should be written as "Table" in the text and be described briefly in English, left-aligned. All the abbreviations used should be described under the tables or figures. The first letter of the title of a table should be a capital letter, and do not use a period if the description is not a complete sentence. The table should be included one in a page as double space, written clearly and briefly. No vertical or horizontal lines are allowed to be included within a table. Title all tables and number them with Arabic numerals at the top of them, and table footnotes or description should be given markers in the order of a), b), c) ...

Figures

Figures should be written as "Fig." in the text. The minimum requirements for digital resolution are:

1,200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs.

300 DPI/PPI for picture-only photographs.

600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows.

Text Style, Numbers and Units

If foreign-language words are needed, capital and small letters should be clarified: in principal, proper nouns, place names, and names of persons should be written with capital letter as the first letter and then small letters for the rest. When translated words are insufficient in conveying meanings, the translated term will be presented with the original term within parenthesis for the first time and then the translated term only can be used. Numbers should be written with Arabic numerals. The measurements of length, height, weight, and volume shall be recorded with the metric system (meters, grams, and liters), temperature shall be recorded with centigrade, and blood pressure shall be recorded with mmHg. The hematological or clinical test measurements shall be recorded on the basis of common units or the system of the International Units (SI).

SUBMISSION OF MANUSCRIPT

All the manuscripts are submitted via the electronic article submission system of the website of the Journal of Exercise Rehabilitation (<http://www.e-jer.org>) with written consents containing all the authors' signatures on copyright transfer. When the publication is approved by the Editorial Board after reviewing, one final version of the manuscript of the article and the file containing all the contents should be finally submitted to the Editorial Board via the Internet article submission system.

The submission day of a manuscript shall be the day when the manuscript is submitted, the author(s) is finally approved, and is delivered to the Editorial Board, and the day of decision of the publication shall be the day when the manuscript is completed of its

reviewing and is decided to be published. Detailed information on manuscript submission and journal edition is provided in the "Online System Guide" in the website. More information on using the system can be inquired using the below- mentioned address.

REVIEW OF MANUSCRIPTS

Editorial Board

The Editorial Board deals with all the works for accepting and editing manuscripts. A manuscript that is not complied with the regulations for submission can be suggested to be adjusted or be reserved to be published, or can be adjusted by the Board, if necessary, without affecting the original contents. A manuscript with sufficient errors in form or misspellings or the one that is not complied with the regulations for submission can be rejected of acceptance and the author(s) will be notified. In case of reviewer(s)'s request, submission of data can be required for the author(s) via the decision of the Editorial Board.

Reviewing and Publication of Manuscripts

All the submitted manuscripts shall be conducted of peer review of three professionals on the basis of the regulations for article reviewing of the Korean Society of Exercise Rehabilitation, and be decided of its publication after reviewing of the Editorial Board. When the reviewing decisions are different each other, the selection of the relevant manuscript shall be decided after re-reviewing of the Board. A manuscript shall be considered of relinquishment of its publication when it won't be submitted within two months of notifying the decision of the reviewing without specific reason. A selected manuscript shall be decided of its order of publication by consideration of its type and the day of deciding its publication by the Editorial Board.