

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

JULIANA SOBRAL ANTUNES

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO DE SUBIDA EM ESCADA, SOBRE
A REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA, EM MODELO EXPERIMENTAL
DE CIATALGIA**

CASCADEL - PR

Março / 2016

JULIANA SOBRAL ANTUNES

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO DE SUBIDA EM ESCADA, SOBRE
A REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA, EM MODELO EXPERIMENTAL
DE CIATALGIA**

Defesa de 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 obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Processo saúde e doença

Orientador: Prof^o Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini

Co-orientadora: Profa. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro

CASCADEL – PR

Março / 2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A642e

Antunes, Juliana Sobral

Efeito do exercício físico resistido de subida em escada, sobre a regeneração nervosa periférica, em modelo experimental de Cialgia. /Juliana Sobral Antunes. Cascavel, PR: UNIOESTE, 2016. 97 f.

Orientador: Prof. Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini
Coorientadora: Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2016.

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

1. Nervo isquiático. 2. Exercício físico. 3. Regeneração nervosa. I. Bertolini, Gladson Ricardo Flor. II. Ribeiro, Lucinéia de Fátima Chasko. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 21.ed. 615.82
616.8

CIP-NBR 12899

FOLHA DE APROVAÇÃO

JULIANA SOBRAL ANTUNES

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO DE SUBIDA EM ESCADA, SOBRE
A REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA, EM MODELO EXPERIMENTAL
DE CIATALGIA**

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.

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

Prof. Dr. Humberto de Sousa Fontoura
Universidade Estadual de Goiás (UEG)

Prof^a. Dra. Patricia Oehlmeyer Nassar
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)

CASCAVEL – PR

Março / 2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação. Foi uma grande honra ser orientanda de um excelente professor, o qual possui um enorme coração.

À minha co-orientadora, professora Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro. Muito obrigada pela parceria, paciência e disponibilidade de tantos anos.

À professora Dra. Rose Meire Costa Brancalhão, que tantas vezes se colocou a disposição para me auxiliar durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À professora Dra. Maria Lúcia Bonfleur, pela disposição em auxiliar neste estudo.

Aos professores: Dr. Humberto de Sousa Fontoura, Dra. Patrícia Oehlmeyer Nassar, Dr. Carlos Augusto Nassar, Dra. Leda Paes Walcker, membros e suplentes da banca, pela disponibilidade.

A todos os alunos de graduação, iniciação científica, mestrado, doutorado e demais funcionários dos laboratórios, LAERF, LABEF e LAFEM, com destaque ao técnico Assis Escher, e as colegas, Keli Lovison, Ana Luiza Peretti, Jhenifer Karvat, Lizyana Vieira, por toda ajuda prestada no decorrer destes 2 anos.

Ao programa de pós-graduação em Biociências e Saúde e à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade do desenvolvimento deste estudo.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos, sem excessão, muito obrigada!

"Todo conhecimento começa com o sonho.

O sonho nada mais é que a aventura pelo mar desconhecido, em busca da terra sonhada. Mas sonhar é coisa que não se ensina, brota das profundezas do corpo, como a alegria brota das profundezas da terra. Como mestre, só posso então lhe dizer uma coisa. Conte-me os seus sonhos para que sonhemos juntos"

Rubem Alves

RESUMO GERAL

A pesquisa é de caráter experimental, quantitativa e randomizada, que teve como objetivo, analisar o efeito do exercício físico resistido de subida em escada, sobre a regeneração do nervo isquiático de ratos *Wistar*. A amostra foi composta por 24 animais, separados aleatoriamente em quatro grupos: GC – controle; GE – somente exercitado; GL – lesionado e não tratado; e GLE – lesionado e tratado. A lesão compressiva do nervo isquiático direito foi efetuada nos animais anestesiados e consistiu em realizar um pinçamento no nervo por 30 segundos com pinça hemostática. A partir do terceiro dia de pós-operatório, os animais de GE e GLE foram submetidos ao exercício físico resistido de subida em escada, sendo realizadas duas séries de dez subidas na escada, com sobrecarga de 100 gramas adaptada a sua cauda, com intervalo de um minuto entre uma série e outra, 5 dias por semana durante 3 semanas. Ao decorrer deste período, todos os animais foram avaliados, quanto a presença de edema e limiar nociceptivo do membro pélvico direito. Ao término do tratamento, os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta de um fragmento de dois centímetros do nervo isquiático direito, o qual foi submetido a processamento histológico de rotina, para análise morfológica e à técnica de Western Blotting para análise molecular. Com relação aos resultados da avaliação do edema, observou-se diferença significava somente na comparação entre as avaliações ($p < 0,001$), denotando redução do volume do membro ao longo do tempo, porém não houve diferença significativa entre os grupos. Quanto aos resultados da nocicepção no local da lesão e na região plantar, foi possível observar diferença entre as avaliações ($p < 0,001$), sendo que o limiar nociceptivo aumentou com o passar do tempo de estudo, porém entre os grupos, so houve diferença entre GC e GE comparado a GL e GLE, sendo que os primeiros obtiveram resultados maiores. Referente a análise histológica, GC e GE apresentaram aspecto normal em todo tecido nervoso, já GL e GLE mostraram grande quantidade de infiltrado inflamatório, degeneração e desorganização das fibras nervosas, porém em GLE encontrou-se também fibras nervosas integras. Com relação a análise

morfométrica, não ocorreu diferença significativa entre os grupos, quanto a, densidade de fibras, quantidade de axônios e ao quociente G; Para o diâmetro da fibra nervosa e da bainha de mielina, GC e GE apresentaram resultados significativamente maiores quando comparados ao GL e GLE; e quanto ao diâmetro do axônio GC obteve resultados significativamente maiores que os demais grupos. E por fim, a análise molecular, mostrou valores maiores do fator neurotrófico derivado encéfalo nos grupos lesionados. Portanto, conclui-se que o modelo de lesão realizado neste estudo foi efetivo, pois causou alterações significativas no nervo isquiático dos animais, porém o exercício físico resistido de subida em escada, nos parâmetros propostos, não foi significativamente eficiente na redução do edema e da dor dos animais, bem como não conseguiu acelerar a regeneração morfológica do nervo isquiático após lesão compressiva.

Palavras-chave: Nervo isquiático, exercício físico, regeneração nervosa.

GENERAL ABSTRACT

The research is experimental, quantitative and random character, which aimed to analyze the effect of resistance exercise climb stairs, on the regeneration of the sciatic nerve of Wistar rats. The sample consisted of 24 animals were randomly separated into four groups: GC - control; GE - only exercised; GL - injured and untreated; and GLE - injured and treated. The compressive lesion of the right sciatic nerve was performed in anesthetized animals and was to conduct a nerve impingement in 30 seconds with hemostat. From the third day after surgery, the animals of GE and GLE were submitted to resistance exercise climb stairs, and made two sets of ten climbs the ladder with overhead 100 grams adapted to its tail, with an interval of one minute between one series and another 5 days a week for 3 weeks. In the course of this period, all animals were evaluated for the presence of edema and nociceptive threshold of the right hind limb. After treatment, the animals were anesthetized and euthanized to collect a fragment of two centimeters of the right sciatic nerve, which was subjected to routine histological processing, for morphological analysis and Western blotting technique for molecular analysis. Regarding edema evaluation results, there was only meant difference in comparing the evaluations ($p < 0.001$), indicating reduced over time member of the volume, but there was no significant difference between groups. With regard to nociception results in the lesion site and planting region was observed difference between the ratings ($p < 0.001$), and the nociceptive threshold increased over the study time, however between the groups, so there was difference between compared to GC and GE, GL and GLE, with the former had higher results. Regarding histological analysis, GC and G2 showed normal appearance around nerve tissue, as GL and GLE showed large amount of inflammatory infiltrate, degeneration and disruption of nerve fibers, but in GLE also met you merge nerve fibers. Regarding the morphometric analysis, no significant difference between the groups, as, fiber density, amount of axons and the quotient G; For the nerve fiber diameter and myelin sheath, GC and GE were significantly better results when compared to GL and GLE; and as the diameter of the axon GC obtained significantly higher results

than the other groups. Finally, molecular analysis showed values higher brain-derived neurotrophic factor in injured groups. Therefore, it is concluded that the injury model in the present study was effective to cause significant changes in the sciatic nerve of the animal, but resisted exercise climb stairs, the proposed parameters was not significantly effective in reducing edema and pain of animals and could not accelerate morphological regeneration after sciatic nerve compression injury.

Keywords: Sciatic nerve, exercise, nerve regeneration.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. REVISÃO GERAL DE LITERATURA.....	18
3.1 Anatomia do nervo periférico.....	18
3.2 Classificações das lesões nervosas periféricas.....	20
3.3 Fisiopatologia da LNP.....	23
3.4 Degeneração e regeneração axonal.....	23
3.4 Exercício físico resistido como modalidade de tratamento para LNP.....	27
3.4 Exercício físico sobre o processo inflamatório e dor neuropática.....	29
3.5 Efeito do exercício físico sobre a liberação de fatores neurotróficos.....	32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
5. ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	39
6. ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	61
7. ANEXOS.....	88

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Nervo periférico envolto pelas bainhas de tecido conjuntivo, endoneuro, perineuro e epineuro.....	18
Figura 2 -	Origem e trajeto do nervo isquiático no corpo humano.....	19
Figura 3 -	Trajeto do nervo isquiático de ratos <i>Wistar</i>	20
Figura 4 -	Fibra nervosa normal e os três graus de lesão nervosa, conforme classificação de Seddon.....	22
Figura 5 -	Graus de lesão nervosa periférica, segundo Sunderland	22
Figura 6 -	Degeneração e regeneração de uma fibra nervosa periférica.....	25
Figura 7-	Crescimento neural a partir dos cones de crescimento.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

G	Grupo
LELRF	Laboratório de estudo das lesões e recursos fisioterapêuticos
LABEF	Laboratório de biologia estrutural e funcional
LAFEM	Laboratório de fisiologia endócrina e metabolismo
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
LNP	Lesão nervosa periférica
NGF	Fator de crescimento neural
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
SNP	Sistema nervoso periférico
L4	Quarta vértebra lombar
S3	Terceira vértebra sacral
SNC	Sistema nervoso central
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
cm	Centímetros
PO	Pós-operatório
AV	Avaliação
ml	Mililitros
mg/Kg	Miligramas por quilo
µm	Micrômetros
HE	Hematoxilina e eosina
DAX	Diâmetro do axônio
DFN	Diâmetro da fibra nervosa
DBM	Diâmetro da bainha de mielina

1. INTRODUÇÃO GERAL

As lesões nervosas periféricas (LNP) são um problema frequente na prática clínica, que podem gerar alterações físicas e funcionais, resultando em dor e sequelas, muitas vezes permanentes, o que leva à redução da qualidade de vida do paciente, com consequências socioeconômicas (ESER *et al.*, 2009; SEBBEN *et al.*, 2011). Segundo Albornoz *et al.* (2011), nos Estados Unidos e na Europa, cerca de 100.000 pacientes são submetidos anualmente a procedimentos cirúrgicos, devido esta condição, denotando a alta incidência dessas lesões.

As LNP mais frequentes em membros inferiores são as que acometem o nervo isquiático e destacam-se como principais fatores etiológicos traumáticos deste tipo de lesão, acidentes com veículos automotores, traumas por arma de fogo e arma branca, quedas, causas iatrogênicas, trações, lacerações, estiramento, pinçamento, compressão e esmagamento do tecido nervoso (CAMPBELL, 2008; ESER *et al.*, 2009). Como resultado da lesão do nervo isquiático, inicia-se um processo de dor no trajeto do mesmo, denominado lombociatalgia ou ciatalgia (STAFFORD; PENG; HILL, 2007).

Atualmente existem vários recursos que podem ser empregados no tratamento das LNP, como por exemplo, o tratamento fisioterapêutico, a terapia medicamentosa e os procedimentos cirúrgicos, sendo que estes estão indicados somente nos casos de comprometimento neurológico severo, dor significativa ou falência absoluta do tratamento clínico (HELFENSTEIN; GOLDENFUM; SIENA, 2010). Porém, tem-se dado atenção especial ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas não cirúrgicas, que auxiliem no processo de regeneração nervosa e melhora funcional após LNP, entre elas destaca-se o exercício físico (ALBORNOZ *et al.*, 2011).

O exercício físico pode ser benéfico no tratamento das LNP, porque já foi demonstrado que o mesmo consegue induzir a síntese de fatores neurotróficos em ratos, então poderia formar um meio útil de estímulo ao crescimento de axônios periféricos. Além disso, estima-se que o exercício

poderia reforçar a regeneração do axônio, sem aumentar a desorientação dos mesmos rumo aos seus órgãos alvos (ENGLISH; WILHELM; SABATIER, 2011).

Vários estudos têm investigado os efeitos de diferentes tipos de exercícios físicos, dentre eles, o resistido, sobre a regeneração nervosa periférica, mostrando que estes podem contribuir para a melhora funcional e morfológica dos nervos lesionados, visto que geram um aumento da velocidade de condução do impulso nervoso e recuperação sensório-motora, bem como, atuam na manutenção das propriedades musculares, mantendo o trofismo e minimizando a fraqueza muscular após a desnervação (TEODORI *et al.*, 2011; PAGNUSSAT *et al.*, 2012). Além disso, segundo Pagnussat *et al.* (2012), existem evidências de que a atividade motora pode influenciar na remodelação morfológica e eletrofisiológica da junção neuromuscular, e que a secreção de fatores de crescimento são um dos mecanismos subjacentes à regeneração do nervo, e que são estimulados pelo exercício físico.

Entretanto, outros autores, mostraram que a aplicação de exercícios, como forma de terapia em casos de LNP, não produziram efeitos positivos funcionais e morfológicos, que garantissem a aceleração da regeneração do nervo. E, em alguns casos, o exercício aplicado até retardou o processo de regeneração (ILHA *et al.*, 2008; POSSAMAI *et al.*, 2012; SOBRAL *et al.*, 2008) evidenciando que ainda existem controvérsias na literatura, quanto a influência do exercício físico resistido no tratamento desse tipo de lesão.

Contudo, em comparação com o sistema nervoso central, as fibras nervosas periféricas mantêm, mesmo no adulto, um maior potencial de regeneração pós-traumático. No entanto, na maioria dos casos, o resultado clínico após lesões desses nervos está longe de ser satisfatório e quase nunca a recuperação funcional é completa (RAIMONDO *et al.*, 2011). Assim, há uma necessidade de mais pesquisas sobre o reparo e regeneração do nervo periférico, que reúna diferentes disciplinas que possam contribuir, não só para aumentar o nosso conhecimento sobre os mecanismos biológicos, que fundamentam a complexa sequência de eventos, que segue a lesão do nervo, mas também para definir as melhores estratégias e parâmetros de exercícios físicos, a fim de otimizar a regeneração nervosa pós-traumática e, finalmente, a recuperação motora e sensorial com retorno funcional do paciente.

Portanto, a partir de uma revisão de literatura sobre o tema, surgiu o seguinte problema: O exercício físico resistido de subida em escada produz efeitos terapêuticos sobre o edema, a dor, e a morfologia do nervo isquiático de ratos *Wistar*, submetidos a axonotmese compressiva?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar o efeito do exercício físico resistido de subida em escada, sobre a restauração funcional, morfológica e molecular do nervo isquiático, em ratos *Wistar*.

2.2 Objetivos específicos

Artigo científico 1

- Avaliar o edema do membro pélvico direito;
- Avaliar a nocicepção no local da lesão, do membro pélvico direito;
- Quantificar a densidade de fibras nervosas do nervo isquiático;

Artigo científico 2

- Avaliar a nocicepção plantar, do membro pélvico direito;
- Analisar a estrutura microscópica dos nervos periféricos, para identificar características histológicas normais ou alteradas, como: presença de células inflamatórias, fibras degeneradas, bem como a organização geral do tecido nervoso;
- Quantificar o número de axônios do nervo isquiático direito, o diâmetro do axônio, da fibra nervosa e da bainha de mielina e quociente G do nervo isquiático direito;
- Verificar a expressão de fatores neurotróficos no tecido nervoso, sendo estes o: fator de crescimento neural (NGF) e o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF).

3 REVISÃO GERAL DE LITERATURA

3.1 Anatomia do nervo periférico

Os nervos do sistema nervoso periférico se assemelham a cordões esbranquiçados, e são constituídos por feixes de fibras nervosas, reforçadas por tecido conjuntivo, que possuem irrigação sanguínea abundante, sendo sua função promover a ligação do sistema nervoso central aos órgãos e estruturas periféricas, como os músculos por exemplo (DANGELO; FATTINI, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Seus axônios são agrupados em feixes paralelos, denominado fascículos, e estes são revestidos por bainhas de tecido conjuntivo frouxo, que fornecem suporte ao processo de regeneração axonal. Assim sendo, revestindo cada axônio individualmente tem-se o endoneuro. Já os feixes de axônios ou fascículos, são revestidos pelo perineuro, que contém também fibroblastos, adipócitos e células do sistema imune, como macrófagos, mastócitos e linfócitos. E envolvendo o nervo como um todo, tem-se o epineuro. Estas bainhas conferem grande resistência aos nervos, sendo mais espessas nos nervos superficiais, pois estes são mais expostos aos traumatismos (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SIQUEIRA, 2007).

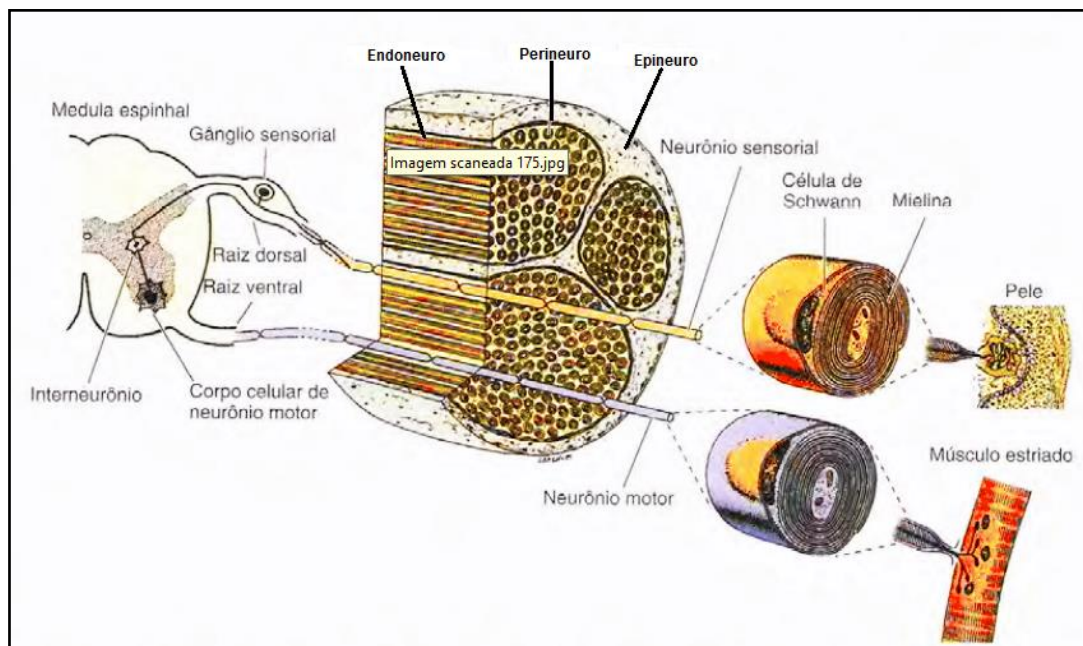


Figura 1. Modelo esquemático do nervo periférico envolto pelas bainhas de tecido conjuntivo, endoneuro, perineuro e epineuro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os axônios são isolados eletricamente pelo próprio endoneuro e por um complexo lipoprotéico denominado bainha de mielina, a qual é produzida no sistema nervoso periférico (SNP), pelas células de Schwann, e tem por função atuar como isolante elétrico, acelerando a propagação dos impulsos nervosos nas fibras mielínicas, além de servir como via de crescimento para as novas fibras nervosas. Na falta da bainha de mielina, as fibras são ditas amielínicas, e os impulsos nervosos são conduzidos de maneira mais lenta (SIQUEIRA, 2007).

O nervo isquiático é o maior nervo periférico do corpo humano, originado pelas raízes nervosas ventrais do plexo lombossacral da medula espinal, no nível da 4^o vértebra lombar (L4) até a 3^o vértebra sacral (S3), emerge da pelve através do forame isquiático maior, passando inferiormente ao músculo piriforme, desce entre o trocânter maior do fêmur e a tuberosidade isquiática, percorre toda a parte posterior dos membros inferiores, sendo que na região poplíteia, se bifurca em dois grandes ramos denominados, nervo tibial (medialmente) e nervo fibular comum (lateralmente). Portanto, o nervo isquiático é responsável pela inervação da parte posterior da coxa, toda a perna e pé (Figura 2) (DISTAD; WEISS, 2013).

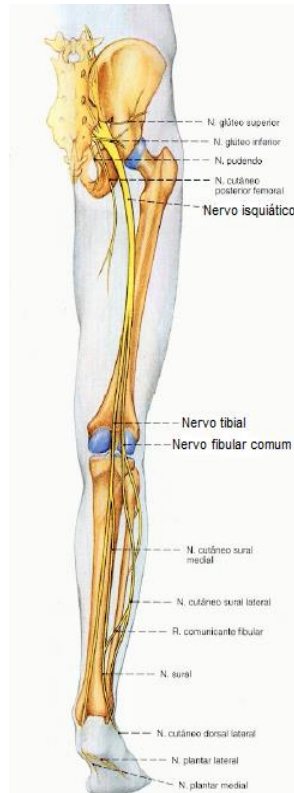


Figura 2. Figura esquemática sobre a origem e trajeto do nervo isquiático no corpo humano (SOBOTTA, 2000).

Cabe destacar também, a anatomia do nervo isquiático de ratos *Wistar*, pois foi esta a espécie animal utilizada no modelo de lesão empregado neste estudo. O nervo isquiático emerge da medula espinal, no nível da 3^o vértebra lombar (L3) até a 6^o vértebra lombar (L6), e na região poplíteia, se bifurca em nervo tibial e fibular comum, inervando os membros pélvicos, semelhante aos humanos. Porém esta localização pode variar e até mesmo não ser simétrica em ambos os membros do animal (Figura 3) (SAVASTANO *et al.*, 2014).

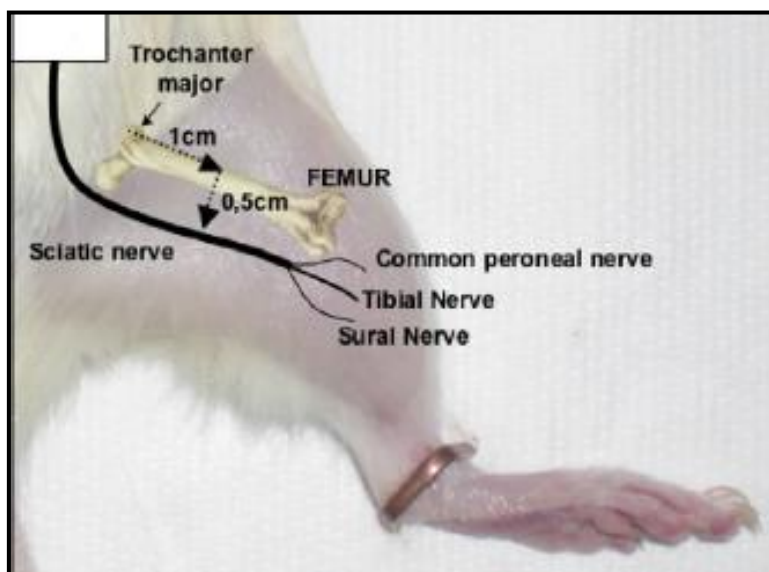


Figura 3. Imagem representando o trajeto do nervo isquiático de ratos *Wistar* (SAVASTANO *et al.*, 2014).

3.2 Classificações das lesões das lesões nervosas periféricas

Lesões de nervos periféricos resultam em aproximadamente 150 bilhões de dólares, gastos anualmente em cuidados de saúde nos Estados Unidos, sendo que quando se refere aos membros inferiores, o nervo mais acometido é o isquiático, em que as causas mais comuns de lesões são de origem traumática, gerando alterações sensoriais e motoras, que podem resultar em paralisia completa do membro ou desenvolvimento de dor neuropática (BURKS *et al.*, 2014, GRINSELL; KEATING, 2014;). Essas lesões têm um impacto profundo sobre a vida do paciente e sua capacidade em realizar suas atividades laborais (FARONI *et al.*, 2015).

O sucesso no reparo do nervo periférico depende da extensão e tipo da lesão. Portanto, sua classificação é importante, pois permite uma correlação das alterações microscópicas que ocorrem no nervo lesionado e a sintomatologia que o paciente apresenta, possibilitando definir corretamente o

prognóstico e o tratamento mais adequado (BURNETT; ZAGER, 2004; SILVA; CAMARGO, 2010).

A classificação das LNP, frequentemente utilizada na prática clínica, é a estabelecida por Sir Herbert Seddon em 1943, que as divide em três graus: neuropraxias, axonotmeses e neurotmeses (SIQUEIRA, 2007).

A neuropraxia é uma lesão leve, caracterizada pela interrupção temporária da condução nervosa, devido ao dano na bainha de mielina do nervo, gerando assim uma desmielinização segmentar, sem anormalidades axonais; os grandes feixes de fibras nervosas são mais afetados, levando a uma leve perda motora e sensitiva. O prognóstico é excelente, devido ao fato de não haver lesão axonal distal; e o bloqueio da condução nervosa é resolvido pela remielinização, e a função do nervo é recuperada completamente em alguns dias ou semanas (Figura 4) (MARTINS *et al.*, 2013; SILVA; CAMARGO, 2010).

Na axonotmese, a maioria do tecido conjuntivo que envolve o nervo permanece preservado, entretanto ocorre bloqueio da condução nervosa, devido perda da continuidade axonal, e também subsequente degeneração Walleriana, ou seja, degeneração da porção distal do axônio lesionado. Neste caso, a regeneração espontânea ainda é possível, apesar de levar um tempo maior, necessitando de vários meses, dependendo da distância entre o órgão alvo e o local da lesão (Figura 4) (JIANG *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2013; SILVA; CAMARGO, 2010; SIQUEIRA, 2007).

A Neurotmeese é o grau mais grave de LNP, em que ocorre a ruptura completa do nervo, ou seja, a perda total da continuidade axonal e do tecido conjuntivo que o envolve, causando deposição de tecido cicatricial, gerando fibrose tecidual, impedindo a regeneração espontânea, o que remete a necessidade de intervenção cirúrgica (Figura 4) (MARTINS *et al.*, 2013).

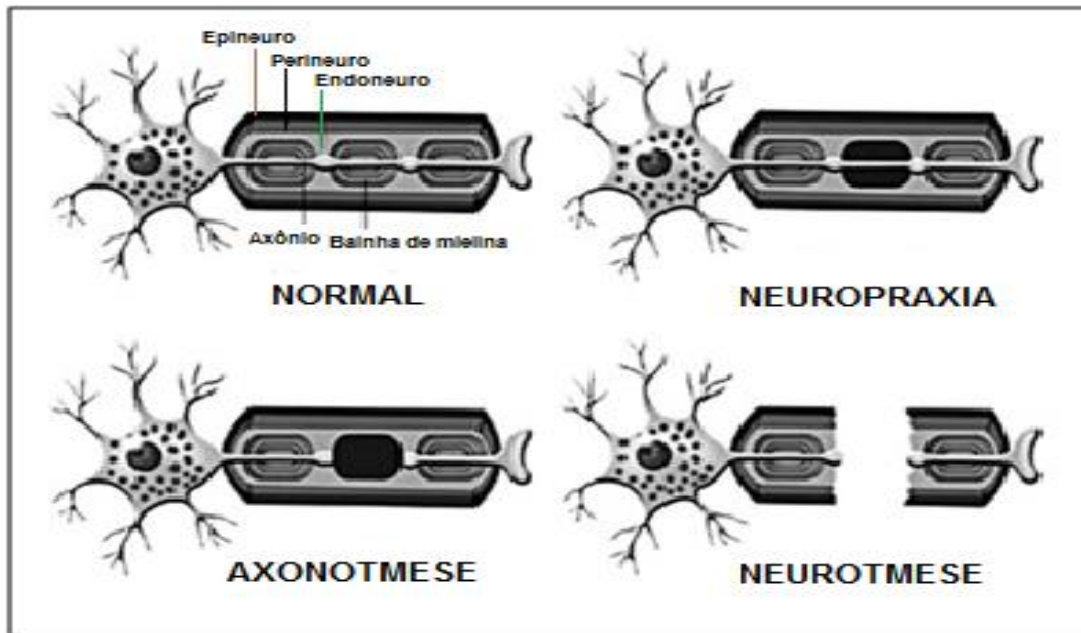


Figura 4. Ilustração esquemática de uma fibra nervosa normal e os três graus de lesão nervosa, conforme classificação de Seddon (MARTINS *et al.*, 2013).

Outra forma de classificar as LNP é seguindo o que foi proposto por Sunderland em 1978, que estabeleceu cinco graus de lesão nervosa, pois subdividiu a axonotmese em três sub-grupos: grau 1: neuropraxia; grau 2: axonotmese (lesão somente do axônio); grau 3: axonotmese (lesão do axônio e do endoneuro); grau 4: axonotmese (lesão do axônio, endoneuro e perineuro); grau 5: neurotmese (Figura 5).

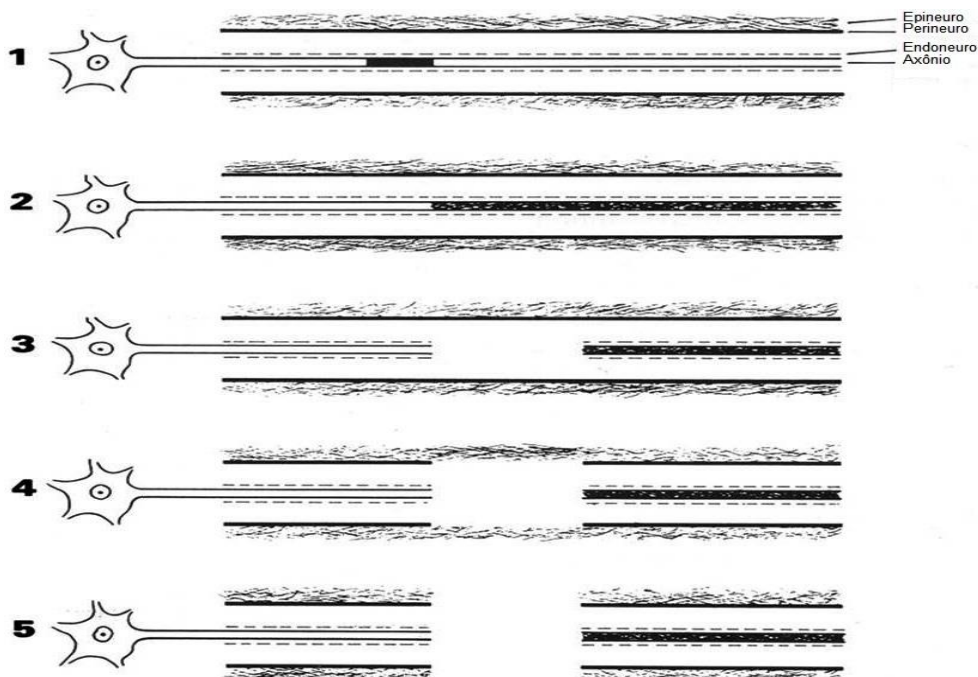


Figura 5. Ilustração dos cinco graus de lesão nervosa periférica, segundo Sunderland. Imagem adaptada de Campbell (2008).

3.3 Fisiopatologia da LNP

As LNP são mais frequentes do que lesões do SNC, e a alta incidência justifica o aumento contínuo do interesse, de pesquisadores básicos e clínicos, estudarem sobre a reparação e regeneração desses nervos. Contudo, essas lesões, geralmente não representam uma ameaça para a vida do paciente, mas quase sempre afetam a qualidade da mesma, o que representa um dos principais alvos de saúde na medicina atual (RAIMONDO *et al.*, 2011).

A compreensão acerca do processo de degeneração e regeneração nervosa periférica tem aumentado significativamente durante as últimas décadas, em simultâneo com os avanços da biologia celular e molecular (BURNETT; ZAGER, 2004).

Desta maneira, sabe-se que quando uma fibra nervosa periférica é lesionada, ela sofre modificações em pontos proximais e distais ao local da lesão. Portanto, a partir da lesão efetuada, inicia-se uma sequência complexa de eventos celulares, que tem como objetivo, remover o tecido nervoso danificado e substituir o segmento nervoso distal que foi degenerado, permitindo assim a reinervação dos órgãos-alvo e restituição de suas respectivas funções (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRE, 2007), embora a recuperação funcional em seres humanos é muitas vezes incompleta (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011).

3.3.1 Degeneração e regeneração axonal

Após uma LNP, os primeiros sinais de degeneração são observados dentro de 24 horas, e se prolongam durante cerca de uma a duas semanas, de proximal para distal (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRE, 2007).

O corpo celular reage à lesão axonal por meio de um processo chamado cromatólise, que tem início em torno de seis horas após a lesão. Essa reação caracteriza-se pela vacuolização do citoplasma, aumento do volume nuclear, deslocamento do núcleo para uma posição mais periférica e edema do corpo neuronal. Ocorre também o rompimento do aparelho de Golgi e o deslocamento da substância de Nissl, devido a um aumento do retículo

endoplasmático granular e dos ribossomos (Figura 6) (BURNETT; ZAGER, 2004).

Além disso, um dano no axônio leva a modificações na porção proximal à lesão, culminando em sua degeneração de maneira retrógrada até chegar ao próximo nódulo de Ranvier, criando uma pequena área de degeneração (RAIMONDO *et al.*, 2011). As células de Schwann (SC) inevitavelmente se degradam ao longo do segmento proximal, os axônios e a mielina se tornam visivelmente reduzidos em diâmetro, o que faz com que a velocidade de condução nervosa seja reduzida. Ainda, se o corpo celular for degenerado, o que pode ocorrer no caso de traumas graves, todo segmento proximal sofrerá degeneração Walleriana e será fagocitado (Figura 6) (BURNETT; ZAGER, 2004).

Com relação às fibras distais à lesão, essas sofrem degeneração a partir de 48–96 horas após a lesão do nervo, por meio de um processo conhecido como degeneração Walleriana, o qual gera um ambiente inflamatório com a acumulação de fatores álgicos, que ativam e sensibilizam as fibras do nervo. Em torno de 24 a 48 horas, se inicia a desintegração do citoesqueleto e degradação do axoplasma e axolema, mediada por aumento nas concentrações intracelulares de cálcio. A porção distal do axônio se degenera, a bainha de mielina se rompe, e dentro de 2 a 3 dias após a lesão, os macrófagos começam a se infiltrar nos cotos nervosos, para realizar a remoção dos restos mielínicos em degeneração, juntamente com a população de macrófagos residentes, posteriormente, as SC desnervadas se proliferam para também desempenhar a função de fagocitose. Eles contribuem ainda para a produção de quimiocinas e citocinas pró e anti-inflamatórias, como o TNF, interleucinas diversas, especialmente a IL-1b e IL-6 (Figura 6) (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRE, 2007, UÇEYLER; SOMMER, 2006).

A proliferação de SC no coto distal ocorre em três dias após a agressão axonal. Essa proliferação está associada com a produção de algumas substâncias difusas que podem atrair os axônios em crescimento. As células de Schwann, desprovidas do contato com os axônios, se diferenciam, proliferam e alinham-se dentro do endoneuro, na forma de um cordão de células chamado de coluna de células de Schwann ou bandas de Büngner (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRE, 2007). Então, arrançadas nessas bandas, as SC,

proporcionam um tropismo mecânico, guiando os axônios em regeneração em direção aos seus alvos e, portanto, são essenciais para o reparo do nervo periférico, uma vez que elas promovem um ambiente permissivo ao crescimento axonal, atuam como células fagocíticas de restos de mielina e secretam fatores tróficos que promovem o crescimento dos axônios, tais como, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), o fator de crescimento neural (NGF) e as proteínas associadas ao crescimento neural (GAP-43) (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011).

Assim sendo, as extremidades distais dos neurônios lesionados formam os “cones de crescimento”, a partir dos quais são gerados brotos regenerativos, que crescem em direção ao órgão-alvo (Figura 6) (BURNETT; ZAGER, 2004).

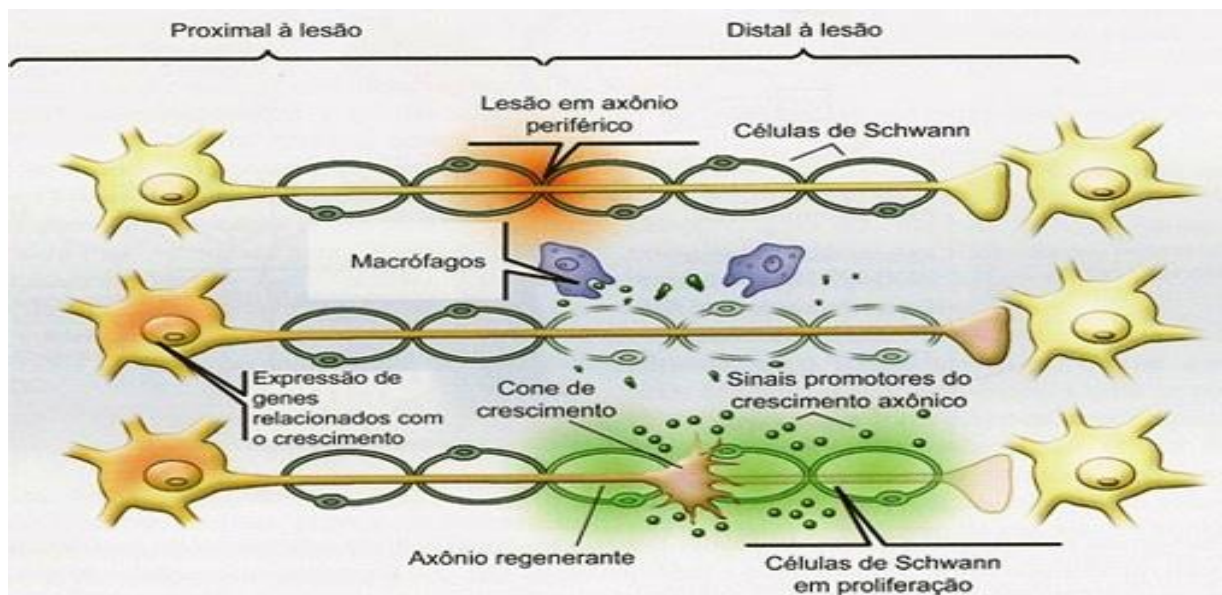


Figura 6. Ilustração da lesão, degeneração e regeneração de uma fibra nervosa periférica

Os cones de crescimento são ricos em mitocôndrias e componentes citoesqueléticos e se propagam em direção aos órgãos-alvo sob a orientação de fatores neurotróficos, quimiocinas e proteínas de adesão celular produzidas no local da lesão. Uma vez que os cones de crescimento estabeleçam adequadas conexões com os órgãos alvos, ocorre formação de uma nova bainha de mielina, pelas células de Schwann, culminando na recuperação funcional (Figura 7) (RUITER *et al.*, 2014).

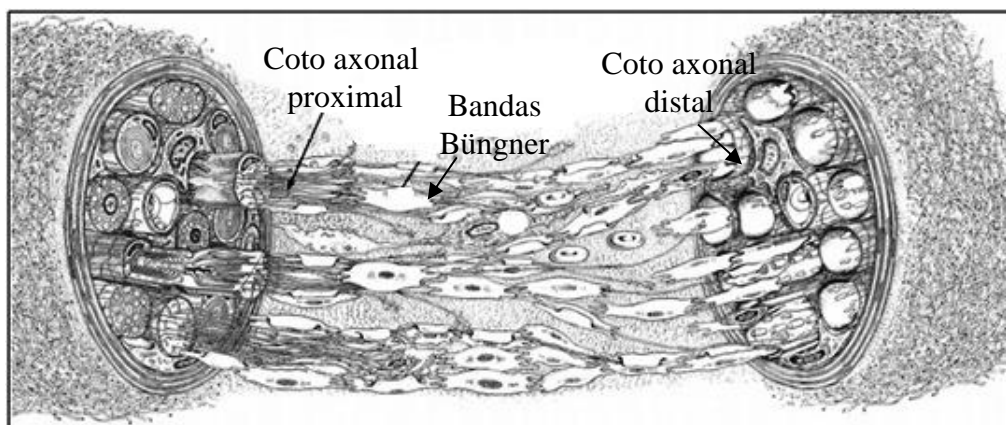


Figura 7. Ilustração do crescimento neural a partir dos cones de crescimento (RUITER *et al.*, 2014).

Contudo, nesse processo muitos brotos axonais aparecem em um cone de crescimento, em torno de 50 a 100, amadurecem e se alongam para atingir o coto do nervo distal. Com isso, ocorre uma poda axonal, devido a formação de neurites. Ou seja, se um tubo receptor ou endoneural não for atingido, ramos nervosos do cone de crescimento, continuam a crescer de uma forma desorganizada, resultando na produção de um neuroma, que pode se manifestar clinicamente como um nódulo doloroso, e isto ocorre com mais frequência em lesões nervosas mais severas, por isso a necessidade de se eliminar os axônios que não alcançarem os órgãos alvos (GRINSELL; KEATING, 2014).

É importante destacar que as SC, constituem 90% das células nucleadas no SNP, tendo sua maior taxa de multiplicação atingida no 3º dia após a lesão, e então elas continuam se multiplicando de maneira mais lenta por duas a três semanas (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRE, 2007). No entanto, este apoio dado por estas células, diminui após 1 a 2 meses de desnervação crônica (BURNETT; ZAGER, 2004).

A taxa de regeneração axonal é lenta, resultando em um crescimento axonal de 1,0 a 2,0 milímetros por dia, entretanto há um período de janela aceito de 12-18 meses para reinervação muscular ocorrer, de modo a conseguir a recuperação funcional. O prazo para a reinervação sensorial é mais longo, mas não infinito (GRINSELL; KEATING, 2014).

3.4 Exercício físico como modalidade de tratamento para LNP

Vários fatores têm sido implicados no mau resultado da regeneração dos nervos, assim como: crescimento axonal lento, insuficiente ou mal direcionado, não atingindo o órgão alvo, atrofia do tecido muscular; mas talvez, o fator mais importante é a extensa morte celular que ocorre após a lesão, uma vez que, o pré-requisito neurobiológico fundamental para a regeneração e recuperação funcional, é que os neurônios mantidos sejam viáveis (FARONI *et al.*, 2015). A partir disso, descobriu-se que o exercício na forma de treinamento em esteira, tem efeitos benéficos sobre estes aspectos críticos da recuperação de nervos periféricos, denotando a importância da introdução do exercício físico no tratamento dessas lesões (ENGLISH; WILHELM; SABATIER, 2011).

Para otimizar o potencial de regeneração do sistema nervoso periférico, e proporcionar uma recuperação funcional eficaz, é necessário utilizar uma combinação de técnicas terapêuticas (RAIMONDO *et al.*, 2011), e dentre essas técnicas disponíveis, destaca-se o uso do exercício físico, haja visto que os estudos têm mostrado que o mesmo pode ser uma ferramenta muito útil nesse processo (ENGLISH; WILHELM; SABATIER, 2011), e a reparação cirúrgica do nervo periférico é, na melhor das hipóteses, apenas parcialmente neuroprotetora e depende de ocorrer em um prazo de até 24 horas após a lesão, para que se obtenha um bom resultado. No entanto, isso nem sempre é clinicamente possível, devido a lesões concomitantes ou atraso no diagnóstico. Portanto, é necessária uma abordagem de tratamento alternativa (FARONI *et al.*, 2015).

Contudo a literatura mostra evidências conflitantes sobre os efeitos benéficos e deletérios do exercício físico sobre a regeneração do nervo periférico. Variações no tipo de lesão do nervo, o exercício aplicado, tempo e intensidade do treinamento, parecem ser os principais fatores que explicam estes resultados controversos. Porém, acredita-se que a manutenção adequada da atividade dos circuitos neurais e a atividade de músculos desnervados, resulta no aumento da liberação de fatores tróficos, principalmente o BDNF, que agem sobre os axônios em regeneração e sobre alterações centrais, acelerando o processo de regeneração e recuperação funcional (UDINA *et al.*, 2011).

Várias formas de treinamento físico são usadas na reabilitação, para ajudar a manter as propriedades musculares durante a desnervação ou paralisia, bem como para, promover a redução do edema inflamatório, da dor e acelerar o processo de regeneração axonal, proporcionando a recuperação funcional após lesões neurais e doenças neurodegenerativas (UDINA *et al.*, 2011).

Pagnussat *et al.* (2012), verificaram o efeito da aplicação de dois diferentes tipos de exercícios físicos, sendo estes, o treinamento de agarrar e treinamento em esteira, realizados por 3 semanas, sobre a recuperação funcional e morfológica do nervo mediano e ulnar de ratos *Wistar*. Os autores constataram que ambos os tipos de exercícios promoveram aceleração da recuperação funcional e morfológica dos animais tratados comparados aos animais do grupo controle, sendo que o exercício em esteira apresentou uma ligeira superioridade em relação ao exercício de agarrar.

Em outro estudo, realizado por Teodori *et al.* (2011), foi verificado a influência do exercício físico resistido de natação, iniciado em fase aguda (logo após a lesão) e tardia (14 dias após a lesão), sobre a regeneração de nervo isquiático de ratos *Wistar*, submetidos a axonotmese por compressão. Neste, o exercício resistido de natação aplicado em ambas as fases da lesão, acelerou a regeneração do nervo isquiático comparado ao grupo controle, reafirmando que o exercício pode ser realizado também em fase inicial da lesão. Entretanto em um estudo anterior, feito por Oliveira *et al.* (2008), em que também foi testado a influência da natação, em fase inicial da lesão compressiva do nervo isquiático de ratos *Wistar*, houve a conclusão que o exercício resistido proposto não foi eficaz para restaurar a funcionalidade do nervo nem os parâmetros morfométricos.

Outros estudos que utilizaram diferentes formas de exercícios mostraram uma ineficiência do exercício sobre a regeneração nervosa. Sobral *et al.* (2008) aplicaram um protocolo de exercício em esteira, iniciado em ambas, fase imediata e tardia da lesão, sobre a recuperação funcional e histomorfométrica, do nervo isquiático de ratos *Wistar*, e constataram que o protocolo de exercício, independente da fase de lesão em que foi iniciado, não influenciou o brotamento axonal, o grau de maturação das fibras nervosas e nem a recuperação funcional.

Possamai, Siepko e Andre (2010), utilizaram um protocolo com exercício resistido de natação por 21 dias, e avaliaram a regeneração do nervo isquiático que foi comprimido, baseado em parâmetros funcionais e morfológicos e verificaram que o exercício foi incapaz de acelerar o processo regenerativo. Mais tarde, em um outro estudo, Possamai *et al.* (2012), utilizaram um protocolo de exercício físico em roda motorizada para ratos *Wistar*, o qual iniciou em diferentes fases da lesão, e concluíram que o exercício físico prejudicou a viabilidade dos cotos neurais distais o que provavelmente foi a causa do atraso na recuperação funcional da marcha desses animais.

O exercício físico resistido de subida em escada (8 séries com 2 minutos de intervalo, com uma sobrecarga aplicada a cauda do animal de 50 até 250 gramas, por cinco semanas), foi estudado e apontado por Ilha *et al.* (2008), como uma ferramenta que não provocou alterações funcionais e morfológicas que levassem a um aumento da velocidade de regeneração do nervo isquiático em ratos *Wistar*, contudo, neste mesmo estudo, os autores verificaram resultados positivos quanto à regeneração do nervo isquiático, quando se utilizou como forma de terapia, o exercício em esteira ergométrica.

3.4.1 Exercício físico sobre o processo inflamatório e a dor neuropática

Em decorrência da lesão nervosa periférica e degeneração Walleriana, ocorre o surgimento de um processo inflamatório e subsequente dor neuropática (UÇEYLER; SOMMER, 2006), contudo o exercício físico pode atuar de forma benéfica para atenuar estas reações.

Em resposta a uma infecção aguda ou trauma, ocorre mudanças nas proteínas chamadas de citocinas e nos inibidores de citocinas podendo aumentar ou diminuir várias vezes (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). De forma geral, as citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que são secretadas, principalmente, mas não exclusivamente, por células imunológicas, tais como células T, macrófagos e neutrófilos. Outras células que secretam citocinas incluem os queratinócitos, células dendríticas da pele, SC e as células gliais do SNC. As citocinas atuam como mediadores intercelulares que regulam as funções e diferenciação de células vizinhas, e são produzidos em resposta à doença, a inflamação, ou danos nos tecidos (LEUNG; CAHILL, 2010).

Tendo em vista a recente descoberta de que a atividade física induz um aumento nos níveis sistêmicos de um número de citocinas com propriedades anti-inflamatórias, discute-se a possibilidade de que o exercício físico exerça tal ação e, assim, proteja contra desordens crônicas associadas à inflamação sistêmica de baixo grau. Com isso, sabe-se que a IL-6 (interleucina-6) é a primeira citocina presente na circulação durante o exercício, sendo que seu nível na circulação aumenta de um modo exponencial (até 100 vezes) em resposta ao exercício, visto que é produzida por meio da contração das fibras musculares, e diminuída durante o período pós-exercício, seguido por um aumento na produção de IL-1ra e IL-10. Com isso, sugere-se que as miocinas, como a IL-6, podem estar envolvidas na mediação dos efeitos benéficos do exercício para a saúde e que estes, em particular, estão envolvidos na defesa contra as doenças crônicas associadas com baixo grau de inflamação. Contudo, considera-se que o aumento de IL-6 no plasma está diretamente relacionado com a intensidade do exercício, duração, e massa muscular recrutada (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Outro sintoma que pode ocorrer após uma LNP é a dor neuropática, tipo reconhecido de dor patológica, em que as respostas nociceptivas persistem para além da resolução do dano do nervo ou seu tecido circundante. Muito frequentemente, a dor neuropática é desproporcionalmente aumentada em intensidade (hiperalgesia) ou aparece em estímulos não dolorosos (alodínia) em relação aos estímulos (LEUNG; CAHILL, 2010).

A dor neuropática pode ser mediada pelo exercício físico, isso foi concluído por meio do estudo de Lana; Paulino; Gonçalves (2006), em que foi verificado os efeitos dos exercícios físicos de baixa e alta intensidade sobre a hipernocicepção. Para tanto, utilizaram ratos da linhagem Wistar, nos quais foi induzida uma resposta inflamatória aguda por meio da injeção do irritante carragenina 0,5%, no coxim plantar posterior esquerdo dos animais. Estes animais foram tratados com 2 tipos de exercícios físicos em esteira motorizada. O primeiro caracterizado como sendo de baixa intensidade, constituiu-se de um treinamento com duração de 12 semanas, 5 vezes por semana, 60 minutos por dia e velocidade foi de 5 metros por minuto, atingindo na última semana, 15 metros por minuto, com uma inclinação da esteira ergométrica mantida em 1%, durante todo o período do treinamento. O segundo padrão de exercício, dito de

alta intensidade, foi caracterizado por ter duração de duração de 11 semanas, 5 vezes por semana, iniciando com 15 minutos, 5 metros por minuto e 0% de inclinação, progredindo para 75 minutos de duração, velocidade de 25 metros por minuto e 15% de inclinação. Constataram que o exercício de alta intensidade aumentou significativamente o limiar nociceptivo dos animais em comparação com o exercício de baixa intensidade.

No estudo de Stagg *et al.* (2011), foi testada a hipótese de que o exercício aeróbico regular, iria reverter a dor neuropática, melhorando os sistemas de modulação da dor mediada por opióides endógenos. Para tanto, ratos da linhagem *Sprague-Dawley* foram submetidos à lesão nervosa periférica e tratados com exercício em esteira motorizada, 5 dias por semana, durante 5 semanas, a uma velocidade de 14-16 metros por minutos com uma inclinação de 8%. A duração do exercício foi gradualmente aumentada em 30 minutos por dia durante 14 dias, sendo avaliado a sensibilidade térmica e tátil. Em alguns animais foi administrado um medicamento antagonista de receptor opióide após o término das sessões de treinamento (naloxona – 1mg/kg). Desta maneira foi observado que o treinamento físico moderado em esteira, conseguiu reverter os sinais de dor neuropática por meio da ação de opióides endógenos em comparação com o grupo de animais sedentários. Contudo, a hipersensibilidade sensorial retornou 5 dias após a interrupção do treinamento físico. Ainda, os autores deste estudo ressaltam que o efeito do exercício é dependente mais da intensidade do que da frequência do exercício.

Contrariamente, Gaffuri *et al.* (2011) aplicaram um protocolo de exercício físico resistido de natação por 30 minutos com e sem sobrecarga de 10% do peso corporal e salto em meio aquático, com sobrecarga de 50% do peso corporal, 4 séries de 5 saltos em ratos *Wistar*, submetidos à compressão do nervo isquiático, e 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, confirmando que o efeito do exercício é diretamente ligado a intensidade do mesmo.

3.4.2 Efeito do exercício físico sobre a liberação de fatores neurotróficos

Atualmente não há tratamentos farmacológicos disponíveis clinicamente que proporcionem a regeneração do nervo periférico. No entanto, várias pequenas moléculas, peptídeos, hormônios e fatores de crescimento têm sido sugeridos como potenciais candidatos para melhorar a regeneração do mesmo, reduzindo a morte neuronal após a lesão e promovendo a regeneração axonal (FARONI, *et al.*, 2015).

Fatores de crescimento dos nervos (neurotrofinas), são moléculas que são naturalmente liberadas na terminação nervosa especialmente após uma LNP e tem por função, promover o crescimento do nervo e prevenir a morte neuronal (GRINSELL; KEATING, 2014). Portanto, a identificação de fatores neurotróficos oferece a possibilidade de uma terapia molecular, como uma abordagem potencial para promover a regeneração nervosa (SUN, *et al.*, 2009).

O Fator de crescimento neural (NGF), é um fator neurotrófico que está presente em baixas concentrações em nervos saudáveis, porém, após a lesão do nervo, o NGF é aumentado no coto distal do mesmo e desempenha um papel importante na sobrevivência de neurônios, promovendo a proliferação e diferenciação dos mesmos (SUN *et al.*, 2009).

Da mesma forma, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), tem sua expressão aumentada transitoriamente em neurônios motores e sensoriais durante os primeiros 2-3 dias após a lesão do nervo periférico. Todavia, apenas uma hora de exercício em esteira, provoca um rápido aumento na expressão desta neurotrofina, que dura pelo menos, uma semana, então conseqüentemente, o BDNF auxilia efetivamente na regeneração axonal (ENGLISH; WILHELM; SABATIER, 2011, FARONI, *et al* 2015).

Em suma, abordagens que envolvam o exercício tem a vantagem de necessitar de baixa tecnologia e, portanto, serem de baixo custo, além de que, permite que os pacientes participem e assumam a responsabilidade por sua própria recuperação. De fato, mesmo dentro dos estudos experimentais, diferenças na intensidade, duração, frequência do exercício e o tempo após a lesão que levou para o treinamento ser iniciado, pode gerar diferentes resultados. Contudo, a meta final é sempre atingir uma recuperação funcional efetiva, o que requer uma quantidade suficiente de axônios regenerados, a

reinervação apropriada do órgão alvo e também a restituição da conectividade central adequada com os circuitos espinais. Desta maneira, os estudos direcionam-se a estabelecer os parâmetros ideais de exercício, para fins de regeneração axonal (ENGLISH; WILHELM; WARD, 2014, UDINA *et al.*, 2011).

REFERÊNCIAS

ALBORNOZ, P. M.; DELGADO, P. J.; FORRIOL, F.; MAFFULLI, N. Non-surgical therapies for peripheral nerve injury. **British Medical Bulletin**, London, v. 100, n. 73, p. 1–28, 2011.

BURKS, S. S.; LEVI, D. J.; HAYES, S.; LEVI, A. D. Challenges in sciatic nerve repair: anatomical considerations. **Journal of Neurosurgery**, Chicago, v. 121, n. 1, p. 210–218, 2014.

BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical Focus**, Charlottesville, v. 16, n. 5, p. 1-7, 2004.

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

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

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.

ENGLISH, A. W.; WILHELM, J. C.; SABATIER, M. J. Enhancing recovery from peripheral nerve injury using treadmill training. **Annals of Anatomy**, New York, v. 193, n. 4, p. 354–361, 2011.

ENGLISH, A. W.; WILHELM, J. C.; WARD, P. J. Exercise, neurotrophins, and axon regeneration in the PNS. **Physiology**, v. 29, p. 437–445, 2014.

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

FARONI, A; MOBASSERI, S. A; KINGHAM, P. J; REID, A. J. Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 82, n.83, p. 160–167, 2015.

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**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 115-118, 2011.

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 8, n. 110, p. 1–13, 2011.

GRINSELL, D.; KEATING, C. P. Peripheral nerve reconstruction after Injury: A Review of clinical and experimental therapies. **BioMed Research International**, New York, p. 1-13, 2014.

HELFENSTEIN, M. JR.; GOLDENFUM, M. A.; SIENA, C. Lombalgia ocupacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 5, p. 583-589, 2010.

ILHA, J.; ARAUJO, R. T.; MALYSZ, T.; HERMEL, E. S.; RIGON, P. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabilitation and neural repair**, New York, v. 22, n. 4, p. 355–366, 2008.

JIANG, N.; LI, H.; SUN, Y.; YIN, D.; ZHAO, Q.; CUI, S.; YAO, D. Differential gene expression in proximal and distal nerve segments of rats with sciatic nerve injury during wallerian degeneration. **Neural Regeneration Research**, Shenyang, v. 9, n.12, p.1186-1194, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LANA, A. C.; PAULINO, C. A.; GONÇALVES, I. D. Influência dos exercícios físicos de baixa e alta intensidade sobre o limiar de hipernocicepção e outros parâmetros em ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 12, n. 5, p. 248-254, 2006.

LEUNG, L.; CAHILL, C. M. TNF- α and neuropathic pain - a review. **Journal of Neuroinflammation**, London, p. 2-11, 2010.

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**, São Paulo, v. 71, n. 10, p. 811–814, 2013.

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

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

PAGNUSSAT, A. S.; MICHAELSEN, S. M.; ACHAVAL, M.; ILHA, J.; HERMEL, E.E.S.; BACK, F. P.; NETTO, C.A. Effect of skilled and unskilled training on nerve regeneration and functional recovery. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, V. 45, n. 8, p. 753-762, 2012.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K.; The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 98, n. 1, p. 154–162, 2005.

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

POSSAMAI, F.; PACHECO, D. R.; SANTOS, T. S.; ANDRÉ, E. S. Repercussões morfológicas e funcionais do exercício sobre a regenera o nervosa periférica. **Fisioterapia e Movimento**, Curitiba, v. 25, n. 3, p. 617-627, 2012.

RAIMONDO, S.; FORNARO, M.; TOSC, P.; BATTISTONC, B.; GIACOBINI-ROBECCHIB, M. G.; GEUNA, S. Perspectives in regeneration and tissue engineering of peripheral nerves. **Annals of Anatomy**, Germany, v. 193, p. 334– 340, 2011.

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

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

SEBBEN, A.D.; COCOLICHIO, F.; SCHMITT, A. P. V.; CURRA, M. D.; SILVA, P. V.; TRES, G. L.; SILVA, J. B. Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 21, n. 2, p. 81-89, 2011.

SEDDON, H. J. **Surgical disorders of the peripheral nerves**, 2^aed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975.

SILVA, C. K.; CAMARGO, E. A. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 3, n. 1, p. 93-98, 2010.

SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Revista de Neurociências**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 226–223, 2007.

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

STAGG, N. J.; MATA, H. P.; IBRAHIM, M. M.; HENRIKSEN, E. J.; PORRECA, F. VANDERAH, T. W.; PHILIP, M. Jr. T. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 114, n. 4, 940-948, 2011.

SOBRAL, L. L.; OLIVEIRAS, 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**, São Carlos, v. 12, n. 4, p. 311-6, 2008.

SOBOTTA, J. Atlas de anatomia humana. 21 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SUNDERLAND, S. **Nerve and nerve injuries**. 2 ed. London: Churchill-Livingston, 1978.

SUN, W.; SUN, C.; ZHAO, H.; LIN, H.; HAN, Q.; WANG, J.; MA, H.; CHEN, B.; XIAO, Z.; DAI, J. Improvement of sciatic nerve regeneration using laminin-binding human NGF-*b*. **Plos One**, San Francisco, v. 4, n. 7, P. 1-10, 2009.

TEODORI, R. M.; BETINI, J.; OLIVEIRA, L. S.; SOBRAL, L. L.; TAKEDA, S. Y.; MONTEBELO, M. I. L. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. **Neural Plasticity**, Patrinton, v. 2011, p. 1-9, 2011.

UÇEYLER, N.; SOMMER, C. Wallerian degeneration and neuropathic pain. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 351-356, 2006.

UDINA, E.; COBIANCHI, S.; ALLODI, I.; NAVARRO, X. Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. **Annals of Anatomy**, New York, v. 193, p. 347– 353, 2011.

4. ARTIGO CIENTÍFICO 1

**EFEITO DO EXERCÍCIO RESISTIDO NA REDUÇÃO DO EDEMA,
NOCICEPÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA EM UM MODELO DE
COMPRESSÃO DO NERVO ISQUIÁTICO**

Publicado na Revista Scientia Medica

<http://dx.doi.org/10.15448/1980-6108.2016.3.23711>

Artigo original em português.

Efeito do exercício resistido na redução do edema, nocicepção e regeneração nervosa em um modelo de compressão do nervo isquiático

Effect of resistance training on the reduction of edema, nociception, and nerve regeneration in a sciatic nerve compression model

Juliana Sobral antunes¹ (ju.antunes2007@hotmail.com)

Keli Lovison² (keli.lovison@hotmail.com)

Jhenifer Karvat² (jhennykarvat@hotmail.com)

Lisyana Vieira² (lizyana@hotmail.com)

Ana Luiza Peretti¹ (analuiza-p@hotmail.com)

Guilherme Hideaki Higuchi³ (guilhermehiguchi@hotmail.com)

Rose Meire Costa Brancalhão⁴ (rosecb@gmail.com)

Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro⁴ (lucineia.cr@gmail.com)

Gladson Ricardo Flor Bertolini⁴ (gladson_ricardo@yahoo.com.br)

1. Mestranda em Biociências e Saúde, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Cascavel, PR, Brasil.
2. Mestre em Biociências e Saúde, pela Unioeste, Cascavel, PR, Brasil.
3. Acadêmico de medicina, pela Unioeste, Cascavel, PR, Brasil.
4. Docente do mestrado em Biociências e Saúde, da Unioeste, Cascavel, PR, Brasil.

Endereço para correspondência

Gladson Ricardo Flor Bertolini, Rua Universitária, 2069, Jardim Universitário, Colegiado de Fisioterapia, 85819-110, Cascavel PR. Fone: (45)3220-7330. E-mail: gladson_ricardo@yahoo.com.br

Não há conflito de interesses.

RESUMO

Objetivo: Analisar os efeitos do exercício físico resistido de subida em escada, sobre o edema, nocicepção e regeneração do nervo isquiático de ratos *Wistar*, submetidos a compressão do nervo isquiático. **Métodos:** 24 ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos com seis animais: grupo controle (GC), grupo exercício (GE), grupo lesão (GL) e grupo tratado (GLE). GL e GLE foram submetidos à compressão do nervo isquiático com pinça hemostática por 30 segundos. A partir do 3º dia após a lesão, iniciou-se o tratamento com exercício resistido de subida em escada para GE e GLE. O tratamento consistiu em realizar duas séries de 10 subidas na escada, com sobrecarga de 100 gramas e intervalo de um minuto entre uma série e outra. O estudo foi conduzido por 22 dias e nesse tempo os animais foram avaliados quanto ao edema e nocicepção. No 22º dia de pós-operatório, os animais foram anestesiados para retirada de um fragmento do nervo isquiático para análise do número de axônios e da densidade de fibras. Após isso, ainda sob efeito da anestesia, os animais foram eutanasiados. Os nervos coletados seguiram protocolo de processamento histológico de rotina. **Resultados:** Com relação ao edema, não houve diferença significativa entre os grupos. Para a nocicepção houve aumento do limiar nociceptivo, comparando o GC com os demais. E para a análise morfométrica, não ocorreu diferença significativa entre os grupos, quanto a quantidade de axônios e a densidade de fibras. **Conclusão:** O exercício físico resistido de subida em escada, nos parâmetros propostos, não foi eficaz para reduzir o edema e a nocicepção e aumentar o número de axônios e a densidade de fibras nervosas.

Descritores: Exercício físico, nervo isquiático, medição da dor, regeneração nervosa.

ABSTRACT

Objective: To analyze the effects of resistance exercise climb stairs, on the edema, nociception and regeneration of the sciatic nerve of Wistar rats subjected to compression of the sciatic nerve. **Methods:** 24 Wistar rats were divided into four groups of six animals: control group (CG), exercise group (EG), injury group (GL) and treated group (GLE). GL and GLE were subjected to sciatic nerve compression with hemostat for 30 seconds. From the 3rd day after injury, began treatment with resistance exercise climb stairs to GE and GLE. The treatment consisted in performing two series of 10 climbs on the ladder with 100 grams overload and one minute interval between one series and another. The study was conducted for 22 days, during which time the animals were evaluated for edema and nociception. After 22 days after surgery, the animals were anesthetized for removal of a sciatic nerve fragment analysis for the number of axons and fiber density. After that, still under anesthesia, the animals were euthanized. Nerves collected following routine histological processing protocol. **Results:** Regarding the edema, there was no significant difference between groups. For nociception was increased nociceptive threshold, comparing the GC with others. And for the morphometric analysis, no significant difference between the groups regarding the amount of axon and fiber density. **Conclusion:** The exercise resistance ladder climb, the proposed parameters, was not effective to reduce edema and nociception and increase the number of axons and nerve fiber density.

Keywords: Exercise physical, sciatic nerve, pain measurement, nerve regeneration.

INTRODUÇÃO

A dor lombar é uma disfunção prevalente em aproximadamente 11,9% da população mundial, sendo que no Brasil, este índice atinge 65%, o que resulta em uma grande demanda aos serviços de saúde, tendo como principais sintomas, a incapacidade funcional e dor, sendo que em alguns casos esta dor é irradiada para os membros inferiores, o que caracteriza um quadro de ciatalgia, ou seja, comprometimento do nervo isquiático com dor ao longo do trajeto do mesmo [1, 2], e isto está presente em 13% a 40% dos casos [3].

As causas gerais da ciatalgia são hérnias de disco, infecções, compressão nervosa, anomalias congênitas, doenças neurológicas degenerativas, disfunções musculoesqueléticas, entre outras [3], o que resulta em danos que diminuem a qualidade de vida das pessoas acometidas, gerando incapacitação física e a perda total ou parcial de suas atividades produtivas, o que origina importantes consequências econômicas [4]. Além disso, muitas vezes a etiologia desse problema é mal compreendida, fazendo com que os cuidados de saúde prestados tenham pouca eficácia [5].

Os tratamentos para esta condição clínica são variados, desde o conservador até o tratamento cirúrgico, porém, tem-se dado atenção especial ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas não cirúrgicas, que auxiliem no processo de regeneração e melhora funcional após lesão nervosa periférica, dentre elas destaca-se o exercício físico [6].

O exercício físico é um tratamento eficaz para vários transtornos dolorosos, resultando em um aumento generalizado da tolerância a dor, durante, imediatamente após e até 30 minutos de seu término, seja este aeróbico ou resistido. Entretanto, os mecanismos fisiológicos que explicam a ação do exercício sobre a dor, não estão bem detalhados, mas os dados de pesquisa disponíveis, sugerem que o exercício físico provoca à liberação de opióides endógenos e a ativação de mecanismos inibitórios nociceptivos na coluna vertebral, levando a diminuição da sensação dolorosa [7].

É relatado na literatura, que o exercício físico atua também sobre o processo inflamatório, pois a contração muscular, estimula a liberação de citocinas anti-inflamatórias e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, auxiliando na atenuação

desse processo [8]. Contudo os efeitos do exercício sobre esta variável, está diretamente relacionada com a intensidade do mesmo [9].

Além disso, o exercício físico pode provocar alterações sobre a morfologia do nervo periférico lesionado, influenciando sobre a velocidade de regeneração axonal, e promovendo maior expressão de proteínas que estimulam o crescimento neural [10].

Baseado no descrito acima, observa-se o quanto o exercício físico pode ser positivo na recuperação de lesões nervosas periféricas. Contudo a maioria dos estudos que tratam esta problemática, utilizam a modalidade de exercício aeróbico [9]. Logo, são poucos os estudos que avaliaram a influência do exercício resistido sobre a regeneração do nervo isquiático, justificando a necessidade de mais pesquisas sobre esta temática. Desta maneira, este estudo objetivou analisar os efeitos do exercício físico resistido de subida em escada, sobre o edema, nocicepção e regeneração do nervo isquiático de ratos *Wistar*, submetidos a modelo experimental de ciatalgia.

MÉTODOS

O presente estudo caracteriza-se como sendo uma pesquisa experimental, de natureza quantitativa e randomizada, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE em 04/2014, e conduzido segundo as normas internacionais de ética em experimentação animal [11].

Grupo experimental

O grupo amostral foi composto por 24 ratos da linhagem *Wistar* [12], machos, com idade média de 10 semanas, pesando em média 352 gramas, que foram obtidos junto ao Biotério Central da Unioeste, e ficaram mantidos no Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos (LELRF) da Unioeste, em caixas padrão de polipropileno, em ambiente com temperatura controlada, em torno de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, compostos por seis animais cada:

- GC – Grupo controle: os animais não foram lesionados nem submetidos ao protocolo de exercício.

- GE – Grupo exercício: os animais não foram lesionados, mas realizam o protocolo de exercício resistido de subida em escada.
- GL – Grupo lesão: os animais foram somente lesionados.
- GLE – Grupo lesão + exercício: os animais foram lesionados e submetidos ao protocolo de tratamento com exercício resistido de subida em escada.

Protocolo de produção da lesão

Os animais submetidos à lesão por compressão do nervo isquiático, foram previamente pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina (95 mg/kg) e cloridrato de xilazina (12 mg/kg), via intraperitoneal. Após verificação do estado de consciência do animal, por meio do pinçamento da cauda e pregas interdigitais, foi realizada a tricotomia da coxa posterior direita e assepsia da região com uso de povidine. Em seguida, foi feita uma incisão, paralela às fibras do bíceps femoral, expondo o nervo isquiático e subsequente compressão do mesmo, com pinça hemostática, durante 30 segundos [13], com a finalidade de reproduzir dor crônica no trajeto do nervo. A pressão de pinçamento foi padronizada para todos os animais, utilizando como referência o segundo dente da cremalheira da pinça hemostática, sendo sempre realizada pelo mesmo pesquisador. Após o pinçamento, foi realizada uma marcação no local da lesão, por sutura epineural, utilizando fio de nylon 10.0, a fim de facilitar a localização da região lesionada na coleta do nervo [14]. Por fim, foi feita a sutura por planos e aplicado povidine sobre o local da incisão e então, os animais foram alojados nas mesmas condições pré-cirúrgicas.

Protocolo de tratamento com exercício resistido de subida em escada

Para a realização do tratamento com exercício resistido, foi utilizada uma escada vertical de madeira, que possuía 67 degraus de ferro, altura de 1,18 metros, largura de 20,5 cm e inclinação de 60° graus. No alto da escada, foi posicionado uma caixa escura, com altura de 18,5 cm e largura de 15 cm, em que os animais descansavam entre uma série e outra de exercício [15].

O procedimento consistiu no animal realizar duas séries de 10 subidas na escada, com sobrecarga de 100 gramas adaptada a sua cauda, e com intervalo de um minuto entre uma série e outra. O protocolo iniciou a partir do terceiro dia após o procedimento cirúrgico (3° PO) e foi conduzido por um período de três semanas, sendo realizadas 15 sessões de tratamento, com intervalo de dois dias a cada cinco sessões consecutivas de

terapia. Para a realização deste exercício, todos os animais foram previamente familiarizados com o equipamento durante duas semanas.

Avaliação do edema

Para o procedimento de avaliação do edema, foi utilizado o membro pélvico direito de todos os animais, e ocorreu pela alteração volumétrica de líquidos (ml), por meio de hidropletismografia, com a utilização de um Pletismômetro de Pata, da marca Insight[®]. Foi introduzido o membro pélvico direito dos animais, até o nível do tornozelo, em um recipiente com água, e pelo deslocamento da água o equipamento quantificava o valor do edema. Os momentos de avaliação do edema iniciaram no 3^oPO, sendo que a AV1 ocorreu no 3^o PO antes do primeiro tratamento e AV2, nesse mesmo dia, logo após o tratamento; a AV3 no 7^o PO após o tratamento; AV4 no 10^o PO antes do tratamento; AV5 no 14^o PO após o tratamento; AV6 ocorreu no 21^o PO após o tratamento; e a última avaliação, AV7, ocorreu no 22^o PO, antes da eutanásia dos animais.

Avaliação da nocicepção

Para avaliação da nocicepção foi utilizado o limiar de retirada à pressão, com auxílio de um analgesímetro digital, tipo filamento de Von Frey, da marca Insight[®] (Ribeirão Preto-SP). O equipamento consiste de um braço com uma ponteira descartável de polipropileno, com a capacidade de avaliar entre 0,1-1000 gramas, ligado a uma caixa amplificadora, ou seja, é um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas [16].

O filamento foi aplicado no local da lesão do animal. Desta maneira, para realização do teste no local da lesão, o animal foi contido manualmente e a ponta do filamento foi aplicada perpendicularmente à área da incisão cirúrgica, exercendo-se uma força com aumento gradual, até que o animal retirasse seu membro, e então o teste era interrompido para registro do limiar de retirada.

Para facilitar a adaptação dos animais a este instrumento, nos três dias anteriores à lesão, foi realizada a simulação desta avaliação [17].

As avaliações referentes à nocicepção ocorreram nos seguintes momentos: a primeira avaliação (AV1) ocorreu pré-lesão; a AV2 no 3^o PO antes do tratamento e AV3, nesse mesmo dia, logo após o tratamento; a AV4 no 7^o PO após o tratamento; AV5 no 10^o PO antes do tratamento; AV6 no 14^o PO após o tratamento; AV7 no 21^o PO após o

tratamento; e a última avaliação, AV8, ocorreu no 22º PO, anteriormente à eutanásia dos animais.

Eutanásia dos animais e coleta das amostras

No 22º PO, os animais foram pesados e anestesiados, sendo dissecado e coletado um fragmento de dois centímetros do nervo isquiático posterior direito dos animais, distal ao procedimento de compressão, localizado a partir da sutura epineural, para realização da análise morfométrica. Após isso, ainda sob efeito do anestésico, os animais foram eutanasiados por meio de decapitação em guilhotina.

Análise morfométrica

Os fragmentos dos nervos coletados foram fixados em paraformoldeído 4% e pós-fixados em tetróxido de ósmio; posteriormente foram processados em técnica histológica de rotina e submetidos a cortes transversais de 5 micrômetros (μm) de espessura [18]. A partir das lâminas histológicas confeccionadas, foi utilizado a objetiva de 100X, para fotomicrografar no aparelho Olympus BX 50, imagens em 4 campos visuais, localizados sistematicamente em quadrantes superior esquerdo (Q1), superior direito (Q2), inferior direito (Q3) e inferior esquerdo (Q4) [19]. Então, a partir destes quadrantes, foi realizado a estimativa do número de axônios e da densidade de fibras nervosas, utilizando o programa Image Pro-Plus 6.0.

Com base nas imagens fotomicrografadas, foi realizado a estimativa do número total de axônios, sendo contabilizados todos os axônios de cada um dos quatro quadrantes e somado, considerando que foram incluídos na contagem os axônios que estivessem tocando as bordas denominadas “de inclusão” (superior e esquerda) e excluindo os que tocassem as bordas “de exclusão” (inferior e direita).

Para estimativa da densidade de fibras nervosas, foram contados os axônios em cada um dos quadrantes e somados, posteriormente divididos pela área dos quadrantes, a fim de se obter uma estimativa do número de axônios contido neste nervo. Esta medida expressa a estimativa da quantidade de fibras nervosas que existe por micrômetro (μm^2) de quadrante.

Análise estatística

Os resultados foram expressos mediante estatística descritiva. A normalidade dos dados foi analisada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os resultados da

avaliação funcional, foram submetidos à estatística inferencial pelo teste de ANOVA misto e os resultados da análise morfométrica, pelo ANOVA unidirecional. Em todos os casos o nível de significância aceito foi de $\alpha=5\%$.

RESULTADOS

Edema do membro pélvico direito dos animais:

Para os valores de edema, foi possível observar diferença significativa somente entre as avaliações ($F(6;15,05)=13,03$; $p<0,001$), não ocorrendo diferença entre os grupos. Desta maneira, os resultados da AV7 foram menores do que todos os outros, sendo os seguintes valores de p: AV7 comparada a AV1 ($p=0,001$), AV7 comparada a AV2 e AV3 ($p<0,001$), AV7 comparada a AV4 ($p=0,020$), AV7 comparada a AV5 ($p=0,002$) e AV7 comparada a AV6 ($p=0,018$). Também AV3 mostrou resultados significativos e maiores, comparados a todas as subsequentes avaliações, desta maneira obteve-se os seguintes valores de p: AV3 comparada a AV4, AV5 e AV7 ($p<0,001$) e comparada a AV6 ($p=0,004$), (tabela 1).

Nociceção no local da lesão:

Observando os dados das 8 avaliações realizadas, foi possível observar diferença significativa ($F(7;14,76)=34,22$; $p<0,001$), sendo que GC apresentou valor significativamente maior que os demais ($p<0,001$). Para as comparações entre as avaliações, foi possível observar que: AV1 foi menor comparada a AV7 e AV8 ($p<0,001$). AV2 também foi menor comparada com a AV4 em diante, com o valor de p oscilando entre $p<0,001$ à $p=0,009$. AV3 foi menor comparada a AV5-AV8, com $p<0,001$ à $p=0,035$. AV4 foi menor comparada à AV6-AV8, com $p<0,001$ à $p=0,013$. AV5 foi menor comparada as duas últimas, sendo $p=0,001$ e $p<0,001$ respectivamente. E AV6 foi menor comparada a AV8, tendo um $p=0,001$ (tabela 2).

Número de axônios:

Quanto ao número de axônios, não houve diferença significativa entre os grupos, ($F(3;20)=0,5412$; $p=0,6632$) (Figura 1A).

Densidade de fibras nervosas:

Com relação a densidade de fibras nervosas não foram encontrados diferenças significativas entre os grupos, ($F(3;20)=0,5412$; $p=0,6632$), (Figura 1B).

DISCUSSÃO

Este estudo, conduzido por 22 dias, testou um programa de treinamento físico resistido de subida em escada, em ratos *Wistar*, visando verificar a influência deste exercício, sobre o edema, a alteração dolorosa neuropática e a morfometria do nervo isquiático, após indução de lesão nervosa periférica.

Com relação a análise dos resultados, referentes a influência do exercício proposto sobre o edema, foi constatado que as primeiras avaliações, apresentaram valores maiores que as últimas. Denotando que nas primeiras sessões de treinamento, o volume do membro posterior direito do animal estava maior, produzindo um maior deslocamento de água durante a realização da avaliação. Isso pode indicar que nos primeiros dias pós-indução da lesão nervosa, os animais apresentavam mais edema. Porém, quando foram comparados os resultados de edema intra-grupos, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa. Entretanto, observando as médias dos valores de edema de cada grupo, nota-se que todos apresentaram um valor médio maior de deslocamento de água, na primeira avaliação comparada com a última, apesar de não ter sido significativo.

Foi possível observar no presente estudo, um aumento de edema na 3ª avaliação comparada as demais. Isso está de acordo com o que a literatura apresenta, visto que, segundo Grinsell e Keatin (2014), em torno de 24-48 horas após a lesão, é o período em que está ocorrendo maior acúmulo de macrófagos e células de schwann no local da lesão, denotando então, um aumento do processo inflamatório no local da lesão neste momento[20].

Outro fator que merece destaque, é que apesar de não existir diferenças entre os grupos, a redução dos valores observada entre as avaliações, pode também indicar hipotrofia muscular, não apenas redução de edema, ou seja, durante o período do estudo, a musculatura esquelética inervada pelo nervo isquiático, pode ter sofrido hipotrofia, o que conseqüentemente reduziria os valores de edema. Zhao *et al.*, (2012), destaca em seu estudo, que a lesão do nervo isquiático causou atrofia e hipotrofia do músculo gastrocnêmio, em ratos da linhagem *Sprague-Dawley*, a partir de 2 semanas após a lesão [21]. Contudo a literatura mostra que o exercício físico pode auxiliar na atenuação do

processo inflamatório, pois por meio da ativação de fibras musculares, ocorre a produção de interleucina-6 (IL-6), que se comporta como uma citosina anti-inflamatória. Por sua vez, esta citocina, estimula o aparecimento na circulação, de outras citocinas anti-inflamatórias, tais como interleucina-1ra (IL-1ra) e a interleucina-10 (IL-10) e ainda inibe a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α [9].

No estudo de Belotto *et al.*, (2010), foi investigado o efeito de um regime de exercício moderado em esteira, por três semanas, sobre marcadores inflamatórios e funções de leucócitos, em ratos *Wistar* diabéticos. Foi observado que o protocolo de exercício aplicado, não foi capaz de causar diferença significativa entre o grupo exercitado e o controle, com relação aos níveis de IL-1ra e IL-10, entretanto, os animais que se exercitaram, obtiveram uma redução de citosinas pró-inflamatórias comparado aos animais sedentários. E que ainda a quantidade liberada de neutrófilos e macrófagos nos ratos diabéticos sedentários foi mais elevado que no grupo exercitado [22].

Ainda cabe ressaltar que, o fato de não ter sido encontrado diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos, pode estar relacionado aos parâmetros do exercício aplicado. Porém há uma linha tênue no quesito intensidade de exercício, pois se forem extenuantes, podem provocar uma lesão muscular e ativação de citosinas pró-inflamatórias, piorando o processo inflamatório [9].

No estudo de English, Wilhelm, Sabatier (2011), que teve como objetivo, comparar os efeitos do exercício físico aeróbico de baixa e alta intensidade em esteira ergométrica, sobre a resposta inflamatória aguda, induzida por injeção de carragenina, no coxim da pata posterior esquerda de ratos *Wistar*, foi utilizado um protocolo de exercício físico de baixa intensidade, conduzido por 12 semanas, com velocidade de 15m/min por 60 minutos por dia. E um protocolo de treinamento de alta intensidade, que ocorreu por 11 semanas, com velocidade de 25 m/min, 75 minutos por dia. Concluíram que o exercício reduziu o edema inflamatório, porém que a eficácia deste, está diretamente relacionado com a intensidade, frequência e duração do mesmo, pois o exercício mais eficiente foi o de alta intensidade [10].

No estudo de Antunes *et al.*, (2012), foi verificado os efeitos do exercício físico resistido de salto em meio aquático, sobre o edema inflamatório, causado por lesão traumática no tendão calcâneo dos animais. O protocolo de exercício consistiu em realizar duas séries de cinco saltos ou quatro séries de cinco saltos na água por uma semana. Com isso constataram que o exercício foi ligeiramente benéfico na redução do edema, sendo o segundo protocolo mais eficaz [23]. Cabe destacar também, que no presente estudo, não

foi realizada uma avaliação de edema pré- lesão, o que impossibilitou uma comparação com valores pré cirúrgicos, sendo esta uma limitação deste estudo.

Sobre os resultados da análise nociceptiva, observou-se que com o passar das avaliações este limiar foi aumentando, visto que os valores médios nas primeiras avaliações foram menores comparados às últimas, o que representa que os animais estavam suportando menos pressão no início do estudo do que no final. Entretanto na comparação entre os grupos, somente houve resultado estatisticamente significativo, comparando o grupo controle com os demais.

O uso do exercício físico é utilizado como uma abordagem não farmacológica para o tratamento da dor neuropática periférica. Esta foi a conclusão do estudo de Belotto *et al.*, (2010), que testou o efeito do exercício de natação na alodínia ao frio e hiperalgesia ao calor, num modelo de ciatalgia, em ratos *Sprague-Dawley* e camundongos CD1. Observaram que 18 a 25 dias de natação após lesão nervosa, diminuiu alodínia ao frio e a hiperalgesia térmica nos animais, e 7 dias de natação, diminuiu a hiperalgesia térmica [22].

Como já visto, no presente estudo não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos, isso pode estar relacionado com o protocolo de exercício aplicado, que pode ter sido muito leve, visto que foram realizadas somente duas séries de 10 subidas na escada e não foi controlado valores de repetição máxima, logo possivelmente seria necessário ter aplicado um protocolo de exercício com uma intensidade maior.

Galdino, Duarte, Perez (2010), investigaram a influência de diferentes protocolos de exercícios resistido, por meio de um modelo de levantamento de peso, sobre o limiar nociceptivo de ratas *Wistar*. O protocolo de exercício consistia em 15 séries de 15 repetições do exercício ou 3 séries de 10 repetições, com carga de até 75% de uma repetição máxima, durante 12 semanas. Um grupo de animais foi submetido ao protocolo de exercícios associado ao uso de uma droga chamada Naloxona (antagonista de opióides endógenos), e observaram que o 1º protocolo foi o mais eficiente, aumentando significativamente o limiar nociceptivo, e que o grupo que associou o exercício com o uso de Naloxona, não obteve melhora da dor [24].

Em um estudo prévio realizado no mesmo laboratório do presente, avaliou-se a eficácia do exercício físico de natação durante 30 minutos, com sobrecarga de 10% do peso corporal, e salto, com sobrecarga de 50% do peso corporal, sendo 4 séries de 5 saltos, por cinco sessões, sobre o quadro algico de ratos *Wistar*, submetidos a um modelo

experimental de ciatalgia, sendo que o exercício não foi eficaz para reduzir o quadro algico dos ratos submetidos a ciatalgia [25]. Logo, novamente cabe ressaltar o papel da intensidade do exercício sobre o efeito de redução da dor, o que possivelmente, foi o principal motivo de não se ter encontrado diferença significativa entre os grupos deste estudo.

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados do presente estudo, foi o tempo que demorou para ser avaliado os animais após a realização do exercício, pois, como observado também no estudo de Galdino, Duarte, Perez (2010), o efeito do exercício sobre a nocicepção ocorre por um período curto após o exercício, aproximadamente 15 minutos, sendo necessário a reavaliação rapidamente [24].

No presente estudo foi verificado também o número de axônios e a partir desse dado, calculado a média de densidade de fibras nervosas, sendo que para ambos, não foi obtido diferença significativa. Esses dados são coerentes, visto que nas imagens analisadas, foi visto que apesar do número de axônios não ter sido diferente entre os grupos, o diâmetro dos mesmos era menor nos grupos lesionados, contudo, foram selecionados e contadas os axônios em cada um dos 4 quadrantes, localizados na periferia da imagem. Porém, posteriormente foi observado nas lâminas histológicas, que a periferia do nervo geralmente apresentava-se com as fibras mais integras do que o centro do mesmo. Então mesmo nos grupos que sofreram lesões, as fibras nervosas mais periféricas estavam mais integras do que as centrais, e isto pode ter influenciado nestes resultados.

Bonetti *et al.*, (2015), avaliaram, a influência do exercício resistido sobre o grau de regeneração do nervo isquiático em ratos *Wistar*, pós lesão por pinçamento, baseando-se em análises morfométricas da porção distal do nervo. Uma das medidas realizadas nos nervos, foi a densidade de fibras nervosas, e diferentemente do presente estudo, constataram que o grupo exercitado obteve valores menores de densidade comparado ao grupo placebo e lesão, porém sugeriram que isto pode ter ocorrido pois o grupo lesão, apresentava grande quantidade de fibras apesar de serem de diâmetros menores [26].

Em suma, conclui-se que o exercício físico resistido de subida em escada, nos parâmetros propostos, não foi eficaz para reduzir o edema, aumentar o limiar nociceptivo e a quantidade e densidade de fibras nervosas significativamente, neste modelo experimental de ciatalgia.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

1. Nascimento PRC, Costa LOP. Prevalência da dor lombar no Brasil: uma revisão sistemática. *Cad Saude Publica*. 2015;31(6):1141-55.
2. Koes BW, Tulder MWV, Thomas S. Diagnosis and treatment of low back pain. *BMJ*. 2006;332(1):1430-4.
3. Stafford MA, Peng P, Hill DA. Sciatica: a review of history, epidemiology, pathogenesis, and the role of epidural steroid injection in management. *Br J Anaesth*. 2007;99(4):461-73.
4. Sebben AD, Cocolichio F, Schmitt APV, Curra MD, Silva PV, Tres GL, Silva JB. Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico. *Scientia Medica*. 2011;21(2):81-9.
5. Dreisinger TE. Exercise in the Management of Chronic Back Pain. *Ochsner J*. 2014;14(1):101-7.
6. Albornoz PM, Delgado PJ, Forriol F, Maffulli N. Non-surgical therapies for peripheral nerve injury. *Br Med Bull*. 2011;100(73):1–28.
7. Nijs J, Kosek E, Oosterwijck JV, Meeus M. Dysfunctional Endogenous Analgesia During Exercise in Patients with Chronic Pain: To Exercise or Not to Exercise? *Pain Physician*; 2012.
8. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005;98(1):1154–62.

9. Lana AC, Paulino CA, Goncalves ID. Efeitos dos exercícios físicos sobre o edema inflamatório agudo em ratos Wistar. *Rev Bras Med Esporte*. 2008;14(1)33-7.
10. English AW, Wilhelm JC, Sabatier MJ. Enhancing recovery from peripheral nerve injury using treadmill training. *Ann Anat*. 2011;193(1)354-61.
11. Schnaider TB, SOUZA C. Aspectos Éticos da Experimentação Animal. *Rev. Bras. Anesthesiol*. 2003;53(2)278-85.
12. Gaffuri J, Meireles A, Rocha BP, Rosa CT, Artifon EL, Silva LI, Moreira NB, Bertolini GRF. Avaliação do Exercício Físico Como Fator de Analgesia em Um Modelo Experimental de Cialgia. *Rev Bras Med Esporte*. 2011;17(2)115-8.
13. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C. Nerve Crush Injuries – A model for Axonotmesis. *Exp Neurol Suppl*. 1994;127(2)284-90.
14. Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. *J. Neurosci Methods*. 2008;173(2)249–58.
15. Hornberger TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*. 2004;29(1)16-31.
16. Vivancos GG, Verri Jr WA, Cunha TM, Schivo IRS, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(1)391-9.
17. Karvat J, Antunes JS, Bernardino GS, Kakihata CMM, Bertolini GRF. Effect of low-level laser and neural mobilization on nociceptive threshold in experimental sciatica. *Rev Dor*. 2014;15(3)207-10.

18. Di Scipio F, Raimondo S, Tos P, Geuna S. A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microsc Res Tech.* 2008;71(1)497-02.
19. Geuna S, Tos P, Guglielmone R, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. *Anat Embryol.*2001; 204(1)1–10.
20. Grinsell D, Keating CP. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *BioMed Research International.* 2014; 2014(1)1-13.
21. Zao L, Guangming LV, Jiang S, Yan Z, Sun J, Wang L, Jiang D. Morphological differences in skeletal muscle atrophy of rats with motor nerve and/or sensory nerve injury. *Neural Regen Res.*2012;7(32)2507-15.
22. Belotto MF, Magdalon J, Rodrigues HG, Vinolo MAR, Curi R, Pithon-Curi TC, Hatanaka E. Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(1)237-43.
23. Antunes JS, Karvat J, Meireles A, Rocha BP, Rosa CT, Silva LI, Bertolini GRF. Exercício resistido em meio aquático para ratos Wistar submetidos a trauma em tendão: avaliação da nocicepção e edema. *Rev Dor.*2012;13(1)55-8.
24. Galdino GS, Duarte IDG, Perez AC. Participation of endogenous opioids in the antinociception induced by resistance exercise in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(9)906-9.
25. Gaffuri J, Meireles A, Rocha BP, Rosa CT, Artifon EL, Silva LI, Moreira NB, Bertolini GRF. Avaliação do Exercício Físico Como Fator de Analgesia em Um Modelo Experimental de Cialgia. *Rev Bras Med Esporte.*2011;17(2) 115-8.

26. Bonetti LV, Schneider APK, Barbosa S, Ilha L, Faccioni-heuser MC. Balance and coordination training and endurance training after nerve injury. *Muscle Nerve*. 2015;51(1)83–91.

Tabela 1 - Dados referentes a estimativa de edema, no membro posterior direito da pata dos animais, submetidos ou não ao exercício resistido de subida em escada (média ± desvio padrão em ml).

GRUPOS - MÉDIA/DESVIO-PADRÃO

AVALIAÇÕES	CONTROLE (GC)	EXERCÍCIO (GE)	LESÃO (GL)	TRATADO (GLE)
AV1	2,38±0,23	1,99±0,31	1,93±0,37	2,07±0,35
AV2	2,34±0,49	1,79±0,44	2,13±0,33	2,3±0,37
AV3•	2,28±0,26	2,38±0,28	2,29±0,21	2,33±0,31
AV4	2,09±0,24	1,95±0,20	1,96±0,39	1,88±0,29
AV5	1,78±0,26	2,15±0,19	2,05±0,18	1,92±0,06
AV6	1,90±0,46	2,01±0,22	1,94±0,22	2±0,31
AV7•	1,89±0,37	1,59±0,28	1,45±0,17	1,83±0,11
MÉDIA	2,09±0,33	1,95±0,27	1,96±0,26	2,04±0,25

(•) Diferença significativa comparada as demais avaliações, considerando p<0,005.

Tabela 2 - Dados referentes a nocicepção no local da lesão, no membro posterior direito dos animais, submetidos ou não ao exercício resistido de subida em escada (média ± desvio padrão em gramas).

GRUPOS - MÉDIA/DESVIO-PADRÃO

AVALIAÇÕES	CONTROLE (GC)	EXERCÍCIO (GE)	LESÃO (GL)	TRATADO (GLE)
AV1•	296,27±44,35	222,70±41,99	185,57±37,15	229,29±38,62
AV2•	227,33±23,71	212,20±43,32	217,19±28,82	203,70±29,72
AV3•	287,16±43,22	214,45±29,85	200,57±28,27	203,54±40,02
AV4•	284,44±28,90	212,58±32,33	242,19±34,86	262,37±23,50
AV5•	354,38±56,39	193,08±33,39	262,00±28,64	232,15±15,61
AV6•	365,83±78,73	244,12±54,59	245,38±43,24	261,12 ±22,70
AV7	327,94± 0,37	308,45±30,78	323,19±32,17	282,45±35,28
AV8	338,77±31,05	332,20±51,73	347,95±28,93	307,29±27,63
MÉDIA	310,26±38,34	242,47±39,74*	252,99±32,76*	247,73±29,13*

(•) Diferenças significativas comparadas a avaliações subsequentes; (*) diferença significativa comparada com G1, considerando p<0,005.

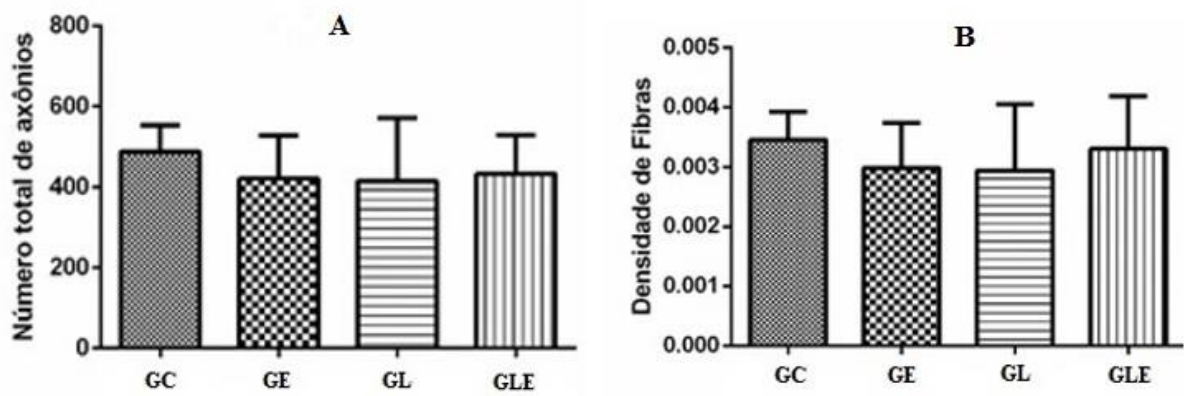


Figura 1. Representação gráfica dos resultados referentes a morfometria. (A), número total de axônios de cada grupo, não sendo encontrado diferença significativa; (B), densidade de fibras nervosas para cada grupo, sem diferença significativa.

APÊNDICE A

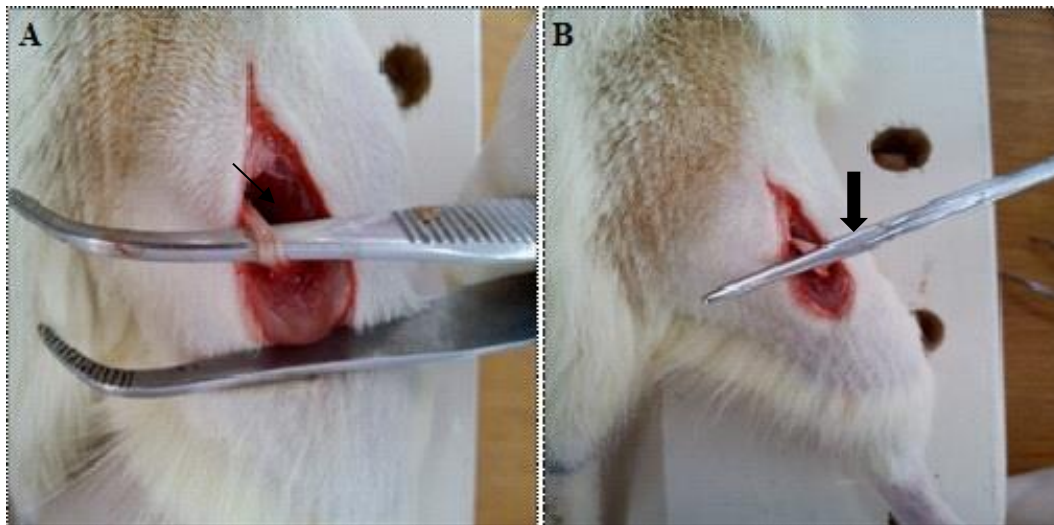


Figura 1 - Fotografias da apresentação e compressão do nervo isquiático. Em (A), exposição do nervo isquiático direito (seta fina preta). Em (B), nervo isquiático direito sendo comprimido com uso de pinça hemostática (seta grossa preta).



Figura 2 – Fotografia do animal realizando o exercício resistido de subida de escada.

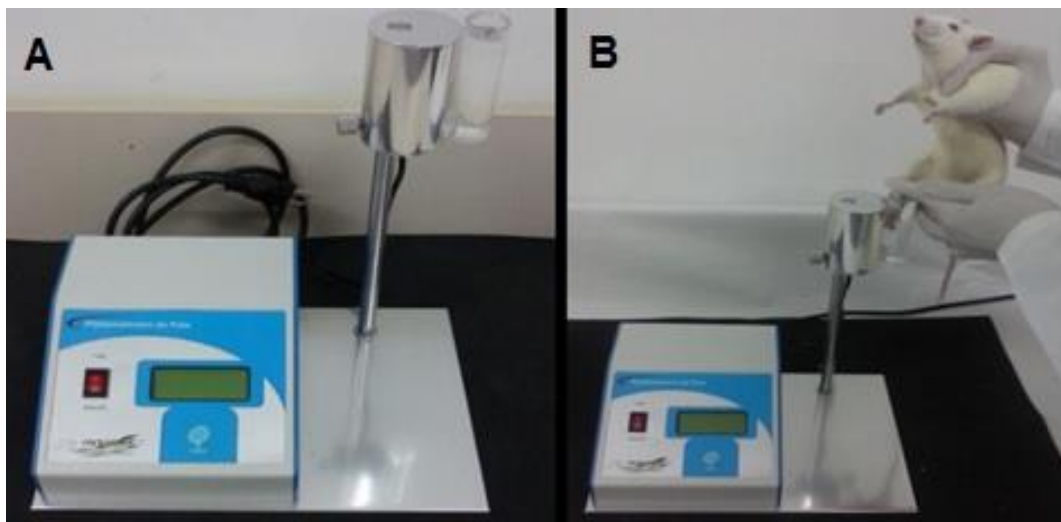


Figura 3 - Avaliação do edema. Em (A), pletismômetro de pata. Em (B), posicionamento do animal para avaliação.

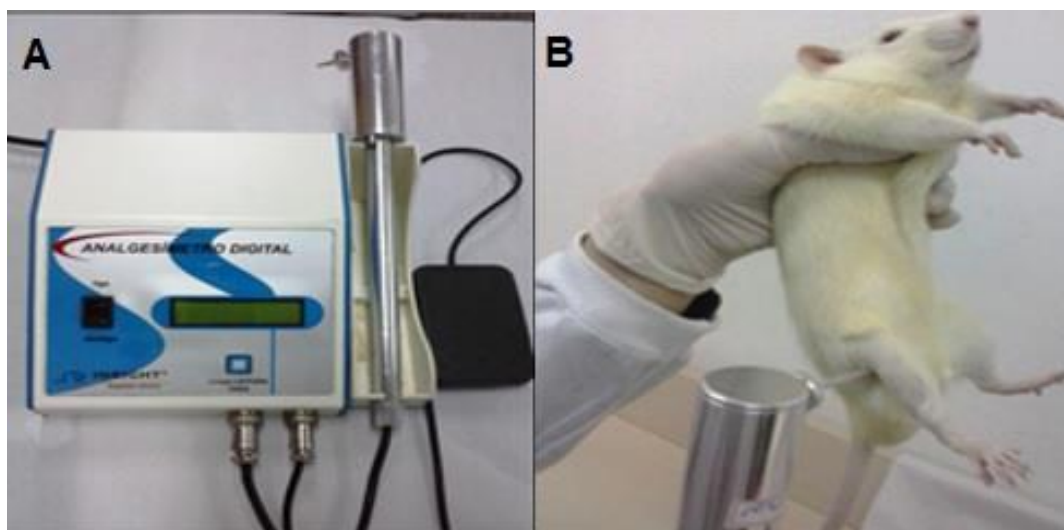


Figura 4 - Avaliação da nociceção. Em (A), equipamento de analgesímetro digital, do tipo filamento de Von Frey. Em (B), posicionamento do animal para avaliação da nociceção no local da lesão.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

AVALIAÇÃO NOCICEPTIVA, NEURONAL E MOLECULAR DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS *W/STAR*, SUBMETIDOS A LESÃO POR COMPRESSÃO E TRATADOS COM EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO

Publicado na revista Pain Research and Management

<http://dx.doi.org/10.1155/2016/6487160>

Avaliação nociceptiva, neuronal e molecular do nervo isquiático de ratos *Wistar*, submetidos a lesão por compressão e tratados com exercício físico resistido

Nociceptive and Neuronal Evaluation of the Sciatic Nerve of
Wistar Rats Subjected to Compression Injury and Treated with
Resistive Exercise

Juliana Sobral Antunes¹, Keli Lovison², Jhenifer Karvat², Ana Luiza Peretti¹, Lizyana Vieira², Guilherme Hideaki Higuchi³, Rose Meire Costa Brancalhão⁴, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro⁴, Gladson Ricardo Flor Bertolini⁴.

¹ Mestrandas em Biociências e Saúde, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Cascavel, PR, Brasil.

² Mestre em Biociências e Saúde, da Unioeste.

³ Acadêmico do curso de medicina da Unioeste, Cascavel, PR, Brasil.

⁴ Docente do Mestrado em Biociências e Saúde da Unioeste, Cascavel, PR, Brasil.

Endereço para correspondência: Gladson Ricardo Flor Bertolini, Rua Universitária, 2069, Jardim Universitário, Colegiado de Fisioterapia, 85819-110, Cascavel PR. Fone: (45) 3220-7330. E-mail: gladson_ricardo@yahoo.com.br

Não há conflito de interesses.

RESUMO

Objetivo: verificar a influência do exercício resistido de subida em escada, sobre a nocicepção, regeneração axonal e expressão de NGF e BDNF no nervo isquiático de ratos *Wistar*. **Métodos:** 24 ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos: grupo controle (GC), grupo exercício (GE), grupo lesão (GL) e grupo tratado (GLE). G3 e G4 foram submetidos à compressão do nervo isquiático com pinça hemostática por 30 segundos. A partir do 3º dia após a lesão, iniciou-se o tratamento com exercício resistido de subida em escada. O tratamento consistiu em realizar duas séries de 10 subidas na escada, com sobrecarga de 100 gramas e intervalo de um minuto entre uma série e outra. O estudo foi conduzido por 22 dias e nesse tempo os animais foram avaliados quanto à alodínia na região plantar. No 22º dia de pós-operatório, os animais foram anestesiados para retirada de um fragmento do nervo isquiático para análise morfológica e molecular. Após isso, ainda sob efeito da anestesia, os animais foram eutanasiados. Os nervos coletados seguiram protocolo de processamento histológico de rotina. **Resultados:** Com relação a alodínia, GC obteve valores menores que GE e maiores que GL e GLE, e a primeira avaliação foi maior que as demais. Os resultados histológicos mostraram que GC e GE, apresentavam aspecto normal em todo o tecido nervoso, já GL e GLE, mostraram-se com grande quantidade de infiltrado inflamatório, degeneração e desorganização das fibras nervosas, e redução da bainha de mielina, contudo GLE, apresentou algumas fibras regeneradas. Os dados morfométricos mostraram que não houve variação quanto ao número de axônios, porém os diâmetros da fibra nervosa, dos axônios, a espessura da bainha de mielina e o quociente G, foram significativos, se apresentando maiores nos grupos não lesionados. Por fim, na análise molecular, foi observado que somente o fator neurotrófico derivado do encéfalo, é que se mostrou aumentado nos grupos lesinados. **Conclusão:** O exercício físico resistido de subida em escada, nos parâmetros propostos, não foi eficaz para acelerar o processo regenerativo dos axônios.

Descritores: Exercício físico, nervo isquiático, regeneração nervosa.

ABSTRACT

Objective: To investigate the influence of resistance exercise climb stairs on nociception, axonal regeneration and expression of NGF and BDNF in the sciatic nerve of Wistar rats.

Methods: 24 Wistar rats were divided into four groups: control group (CG), exercise group (EG), injury group (GL) and treated group (GLE). G3 and G4 were subjected to sciatic nerve compression with hemostat for 30 seconds. From the 3rd day after injury, began treatment with resistance exercise climb stairs. The treatment consisted in performing two series of 10 climbs on the ladder with 100 grams overload and one minute interval between one series and another. The study was conducted for 22 days, during which time the animals were assessed for allodynia on the plantar region. After 22 days after surgery, the animals were anesthetized for removal of a nerve sciatic fragment for morphological and molecular analysis. After that, still under anesthesia, the animals were euthanized. Nerves collected following routine histological processing protocol. **Results:** Regarding allodynia, GC obtained values less than GE and larger than GL and GLE and the first assessment was higher than the others. Histological results showed that GC and GE, had normal appearance throughout the nervous tissue, as GL and GLE showed up with large amounts of inflammatory infiltration, degeneration and disruption of nerve fibers, and reduction of the myelin sheath, however GLE, He presented some regenerated fibers. The morphometric data showed that there was no change in the number of axons, but the diameters of the nerve fiber, the axon, the thickness of the myelin sheath and the G ratio were significant, presenting higher in groups uninjured. Finally, molecular analysis, it was observed that only the brain-derived neurotrophic factor, is that proved increased in lesinados groups. **Conclusion:** resistance exercise climb stairs, the proposed parameters, was not effective to speed up the regenerative process of axons.

Keywords: Exercise physical, sciatic nerve, nerve regeneration.

INTRODUÇÃO

As lesões nervosas periféricas representam um problema clínico, e provocam um impacto profundo e permanente sobre a qualidade de vida do paciente, alterando sua capacidade para realizar as atividades de vida diária, bem como seu retorno ao trabalho (Faroni et al., 2015). Estima-se que, em torno de vinte milhões de americanos sofram lesões de nervo periférico, o que resulta em aproximadamente 150 bilhões de dólares gastos anualmente com cuidados de saúde nos Estados Unidos (Grinsell & Keating, 2014).

As causas mais comuns de lesões nervosas periféricas são acidentes com veículos automotores, lacerações com objetos pontiagudos, fraturas, ferimentos por arma de fogo ou arma branca, entre outras (Eser et al., 2009). Em estudo retrospectivo, Saadat, Eslami & Rahimi-Movaghar (2011) avaliaram 16753 pacientes com algum tipo de lesão nervosa periférica, e verificaram que 90% destes tinham menos de 50 anos de idade, sendo que as principais causas que levaram a este problema, foram acidentes de trânsito, para 58% do entrevistados e quedas para 25%, demonstrando que as causas traumáticas são comumente responsáveis por este tipo de lesão, as quais ocorrem principalmente em indivíduos com idade produtiva.

Em casos de lesões nervosas periféricas localizadas nos membros inferiores, o nervo mais frequentemente acometido é o isquiático (Eser et al., 2009), sendo que as lesões ocorrem principalmente devido à compressão de raiz nervosa, fratura de colo de fêmur, luxação de quadril, contusões, causas iatrogênicas, podendo gerar déficits motores, sensoriais e dor neuropática ao longo do trajeto do nervo (Kim et al., 2004).

Apesar do sistema nervoso periférico (SNP) ter uma capacidade intrínseca de se regenerar, as opções de tratamento disponíveis, em casos graves de compressão, geram resultados insatisfatórios, sendo que atualmente o tratamento de escolha é a reparação microcirúrgica (Faroni et al., 2015), porém, tem-se dado atenção especial ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas não cirúrgicas, que auxiliem no processo de regeneração e melhora funcional após uma lesão nervosa periférica, dentre elas destaca-se o exercício físico (Albornoz et al., 2011).

O exercício físico pode contribuir para o tratamento da lesão nervosa periférica, pelo menos em parte, pois induz a síntese de fatores neurotróficos, que estimulam o crescimento neural. Portanto, o exercício terapêutico, poderia formar um meio útil para a

estimulação do crescimento e regeneração de axónios periféricos (English, Wilhelm & Sabatier, 2011).

Alguns fatores neurotróficos são produzidos e liberados pelas células de Schwann, e então provocam um efeito de neurotropismo, ou seja, guiam o coto do nervo até seu órgão alvo. Diferentes fatores já foram identificados, incluindo o fator de crescimento neural (NGF) e o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Ruitter et al., 2014).

Além disso, a literatura mostra que o exercício físico poderia amenizar a dor neuropática, pois pode provocar a liberação de opióides endógenos no organismo, o que consequentemente leva à redução da dor (Stagg et al., 2011). Desta maneira, o exercício físico poderia influenciar de forma benéfica, no tratamento de lesões nervosas periféricas. Contudo, a maior parte dos estudos que fizeram uso do exercício físico para este fim utilizaram o exercício aeróbico, e poucos estudos utilizaram exercício físico resistido (Boeltz et al., 2013). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a influência do exercício resistido, de subida em escada, sobre a nocicepção, regeneração axonal e expressão de NGF e BDNF no nervo isquiático de ratos *Wistar*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo caracteriza-se como sendo uma pesquisa experimental, de natureza quantitativa e randomizada, o qual foi desenvolvido no laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos (LELRF), no laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) e no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) – Campus de Cascavel, sendo que este, foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), em 04/2014 (anexo 1).

Grupos amostral

O grupo amostral foi composto por 24 ratos da linhagem *Wistar*, machos, com idade média de 10 semanas, pesando em média 352 gramas, os quais foram obtidos junto ao Biotério Central da Unioeste, e ficaram mantidos no LELRF, em caixas padrão de polipropileno, em ambiente com temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, compostos por seis animais cada:

- GC – Grupo controle: os animais não foram lesionados nem submetidos ao protocolo de exercício.
- GE – Grupo exercício: os animais não foram lesionados, mas realizam o protocolo de exercício resistido de subida em escada.
- GL – Grupo Lesão: os animais foram somente lesionados.
- GLE – Grupo Tratado: os animais foram lesionados e submetidos ao protocolo de tratamento com exercício resistido de subida em escada.

Protocolo de Produção da Lesão

Os animais, submetidos à lesão por compressão do nervo isquiático, foram previamente pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina (95 mg/kg) e cloridrato de xilazina (12 mg/kg), via intraperitoneal. Após verificação do estado de consciência do animal, por meio do pinçamento da cauda e pregas interdigitais, foi realizada a tricotomia da coxa posterior direita e assepsia da região com uso de povidine. Em seguida, foi feita uma incisão, paralela às fibras do músculo bíceps femoral, expondo o nervo isquiático e subsequente compressão do mesmo, com pinça hemostática, durante 30 segundos, com a finalidade de reproduzir dor crônica no trajeto do nervo (Bridge et al., 1994).

A pressão de pinçamento foi padronizada para todos os animais, utilizando como referência o segundo dente da cremalheira da pinça hemostática, sendo sempre realizada pelo mesmo pesquisador. Após o pinçamento, foi efetuado uma marcação no local da lesão, por meio de sutura epineural, utilizando fio de nylon 10.0, a fim de facilitar a localização da região lesionada na coleta do nervo (Mazzer et al., 2008). Por fim, foi feita a sutura por planos e aplicado povidine sobre a incisão, e então, os animais foram alojados nas mesmas condições pré-cirúrgicas.

Protocolo de tratamento com exercício resistido de subida em escada

Para a realização do tratamento com exercício resistido, foi utilizada uma escada vertical de madeira, que possui 67 degraus de ferro, altura de 1,18 metros, largura de 20,5 cm e inclinação de 60° graus. No alto da escada, foi posicionada uma caixa escura com altura de 18,5 cm e largura de 15 cm, em que os animais descansavam entre uma série e outra de exercício (Hornberger & Farrar, 2004).

O procedimento consistiu no animal realizar duas séries de 10 subidas na escada, com sobrecarga de 100 gramas adaptada a sua cauda, e com intervalo de um minuto entre

uma série e outra. O tratamento com exercício resistido de subida em escada iniciou, a partir do terceiro dia após o procedimento cirúrgico (3° PO) e foi conduzido por um período de três semanas, sendo realizado 15 sessões de tratamento, com intervalo de dois dias a cada cinco sessões consecutivas de terapia. Para a realização do exercício em escada, todos os animais foram previamente familiarizados com o equipamento durante duas semanas anteriores a cirurgia.

Métodos de avaliação

Avaliação da alodínia

Para avaliação da alodínia foi utilizado o limiar de retirada à pressão, com auxílio de um analgesímetro digital, tipo filamento de Von Frey, da marca Insight® (Ribeirão Preto-SP). O equipamento consiste de um braço com uma ponteira descartável de polipropileno, com a capacidade de avaliar entre 0,1-1000 gramas, ligado a uma caixa amplificadora, ou seja, é um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (Vivancos et al., 2004).

O filamento foi aplicado na região plantar da pata posterior direita do animal. Para tanto, o animal foi mantido em caixa de madeira elevada, com piso de tela, e com o filamento posicionado a 90° graus com a pata do animal, foi aplicada uma pressão com aumento gradual nesta região, até que o animal retirasse o seu membro, anotando-se em seguida o valor do limiar de retirada apontado pelo aparelho. Para facilitar a adaptação dos animais a este instrumento, nos três dias anteriores à lesão, foi realizada a simulação desta avaliação (Gaffuri et al., 2011).

As avaliações referentes à alodínia ocorreram nos seguintes momentos: a primeira avaliação (AV1) ocorreu pré-lesão; a AV2 no 3° PO antes do tratamento e AV3, nesse mesmo dia, logo após o tratamento; a AV4 no 7° PO após o tratamento; AV5 no 10° PO antes do tratamento; AV6 no 14° PO após o tratamento; AV7 no 21° PO após o tratamento; e a última avaliação, AV8, ocorreu no 22° PO, anteriormente à eutanásia dos animais.

Eutanásia dos animais e coleta das amostras

No 22° PO, os animais foram pesados e anestesiados, sendo dissecado e coletado um fragmento de dois centímetros do nervo isquiático posterior direito dos animais, distal ao procedimento de compressão, localizado a partir da sutura epineural, para realização

de análise morfológica e molecular. Após isso, ainda sob efeito do anestésico, os animais foram eutanasiados por meio de decapitação em guilhotina.

Análise morfológica

Uma parte, dos fragmentos dos nervos coletados, foi fixado em bouin, inclusos em parafina e submetidos a cortes transversais de 5 micrômetros (μm) de espessura, com posterior coloração pela técnica hematoxilina e eosina (HE), para realização da análise histológica (Junqueira & Carneiro, 2008). Outra porção desses fragmentos, foi fixada em paraformaldeído 4% e pós-fixada em tetróxido de ósmio, processada em técnica histológica de rotina e submetidos a cortes transversais de 5 μm de espessura, para realização da análise morfométrica (Di Scipio et al., 2008).

Análise histológica

Na análise histológica, foram observadas e descritas as características visualizadas no laminário, quanto as seguintes estruturas: epineuro, perineuro e endoneuro, fibra nervosa, infiltrado inflamatório, células de Schwann, fibroblastos e vasos sanguíneos. Os resultados foram apresentados de forma descritiva, a partir de uma detalhada observação do laminário e ilustrados em uma prancha histológica, montada com as imagens fotomicrografadas de cada grupo.

Análise morfométrica

A partir das lâminas histológicas confeccionadas, foi selecionado um corte de cada, o qual foi fotomicrografado no aparelho Olympus BX 50. Usando a objetiva de 100X, foram capturadas imagens em 4 campos visuais, localizados sistematicamente em quadrantes superior esquerdo, superior direito, inferior direito e inferior esquerdo, seguindo as recomendações de Geuna et al. (2001), e posteriormente as imagens foram analisadas usando o programa Image Pro-Plus 6.0.

Com base nas imagens fotomicrografadas, foi realizado a medida do diâmetro da fibra nervosa (DFN), do axônio (DAX), e da espessura da bainha de mielina (EBM), e o quociente G (razão entre o DAX/DFN). Estas mensurações foram efetuadas em 100 axônios por nervo, sendo 25 em cada quadrante, a fim de se obter um número equivalente para comparações entre os mesmos, sendo realizadas às cegas sempre pelo mesmo examinador.

Análise molecular

Foram avaliados a expressão de 2 fatores de crescimento neural no nervo isquiático, o NGF e o BDNF, por meio da técnica de Western blotting. Para tanto, um fragmento do nervo isquiático foi retirado e colocado em solução de RNA Later por 24 horas, após isso foi homogeneizado em tampão de extração. Os extratos foram centrifugados a 15000 rpm a 4°C por 40 minutos, para remoção do material insolúvel. A concentração proteica foi determinada usando o método de Bradford com reagente da BioRad. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DTT 10 mM, aquecidas em água fervente por 5 min. Aliquotas com concentrações proteicas iguais foram aplicadas no SDS-PAGE (6 a 10% de Trisacrilamida) em aparelho minigel com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada por duas horas em solução bloqueadora para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir as membranas foram incubadas com anticorpos específicos para as diferentes proteínas a serem analisadas. Subsequentemente, as membranas foram incubadas por uma hora com anticorpo secundário. As bandas proteicas específicas foram detectadas por quimioluminescência e expostas a filmes fotográficos. As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica.

Análise estatística

Os resultados foram expressos mediante estatística descritiva. A normalidade dos dados foi analisada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os resultados da avaliação funcional, foram submetidos à estatística inferencial pelo teste de ANOVA medidas mistas; os resultados da análise morfométrica, pelo ANOVA unidirecional com pós-teste *t* e os resultados da análise molecular foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em todos os casos o nível de significância aceito foi de $\alpha=5\%$.

RESULTADOS

Avaliação da alodínia na região plantar

Analisando os dados das oito avaliações realizadas, foi possível observar diferença significativa ($F(7;15,01)=20,55$; $p<0,001$), na comparação entre os grupos e entre as avaliações.

Na comparação entre os grupos, verificou-se diferença significativa entre GC com os demais, em que este apresentou resultados menores que GE ($p<0,012$), e maiores que GL ($p<0,001$) e GLE ($p<0,001$). Também foi significativa a comparação de GE com GL e GLE, sendo que o GE apresentou resultados maiores ($p<0,001$). Para as comparações entre as avaliações, foi possível observar que AV1 foi maior que AV2 – AV7 ($p<0,001$) e maior que AV8 ($p=0,001$), e AV4 foi menor comparada com AV7 ($p=0,002$) e AV8 ($p=0,011$) (Tabela 1).

Avaliação histológica

A análise histológica do nervo isquiático do grupo controle (GC), revelou que as fibras nervosas se apresentavam com padrão de normalidade, com diferentes diâmetros, presença de núcleos de células de Schwann na periferia da bainha de mielina e núcleos de fibroblastos no endoneuro. O perineuro constituído de tecido conjuntivo modelado, se apresentou envolvendo todo o nervo, formando camadas concêntricas ao redor do mesmo; neste também foram visualizados núcleos pavimentosos de fibroblastos. Adjacente ao perineuro foi observado o epineuro, também constituído de tecido conjuntivo, porém não modelado (Figura 1 – A e B).

No grupo exercício (GE), as características morfológicas se aproximaram ao que foi observado no grupo controle, ou seja, as fibras nervosas se apresentaram de maneira organizada, e não foi encontrado células inflamatórias nem fibras nervosas em degeneração (Figura 1- C e D).

No entanto, no grupo lesão (GL), verificou-se desorganização do tecido nervoso, com fibras nervosas em degeneração, aumento do número de núcleos de células de Schwann, grande quantidade de infiltrado inflamatório, com presença de macrófagos, formando aglomerados de células gigantes, aumento na quantidade de fibroblastos, fibras nervosas de menor diâmetro comparado ao grupo controle. Além disso, a bainha de mielina se apresentou mais delgada e em alguns casos ausente (Figura 1 – E e F).

Já no grupo lesionado e tratado com o exercício (GLE), notou-se fibras nervosas muito heterogêneas, com aspecto morfológico semelhante ao grupo lesão, entretanto outras fibras nervosas se apresentaram parecidas com o visualizado no grupo controle (Figura 1 – G e H).

Avaliação morfológica

Em relação ao DFN obteve-se diferenças significativas, ($F(3;20)=7,69$; $p=0,0016$), quando comparado o GC com o GL e o GLE, sendo o valor de $p<0,001$ para ambos. E também quando comparado o GE com o GL e GLE, sendo $p=0,0439$ e $p=0,0273$ respectivamente, sendo os valores de GC e GE, maiores. (Figura 1A).

Quanto ao DAX obteve-se diferenças significativas, ($F(3;20)=10,27$; $p=0,0004$), quando comparado o GC com os demais grupos, sendo os valores de $p=0,004$ em relação a GE, e para os demais $p<0,001$, sendo que o DAX foi maior no grupo controle (Figura 1B).

No que se refere a espessura da bainha de mielina, o resultado foi semelhante ao DFN, ($F(3;21)=5,49$; $p=0,0062$), ou seja, o GC e GE apresentaram diferenças significativas comparados a GL e GLE. Então, comparando o GC com GL, tem-se valor de $p=0,0189$; GC com GLE apresentou valor de $p=0,0045$; GE com GL obteve valor de $p=0,0217$ e por fim, GE com GLE resultou em $p=0,0053$. Ou seja, a espessura da bainha de mielina se apresentou maior no grupo controle e no grupo escada em relação ao grupo lesão e ao tratado (Figura 1C).

Sobre o quociente G (DAX/DFN), os resultados foram significativos, ($F(3;20)=6,10$; $p=0,0043$), quando comparado o GC com GE, GL e GLE, sendo os valores de $p<0,001$, $p=0,0161$ e $p=0,0033$, respectivamente (Figura 1D).

Avaliação de NGF e BDNF

Quando avaliado a expressão de NGF, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos ($p=0,0563$) (Figura 3A). Entretanto, na análise do BDNF, houve diferenças significativas comparando o GC com GL e GLE ($p<0,005$), sendo que GC obteve valores menores (Figura 3B).

DISCUSSÃO

Sobre os resultados da alodínia na região plantar do membro posterior direito dos animais, observou-se que com o passar das avaliações os valores não se igualaram a avaliação pré lesão, sendo esta em todos os casos, maior, denotando que o exercício não foi eficaz para aumentar o limiar nociceptivo dos animais. Contudo, somente a AV4 mostrou-se significativamente menor que as duas últimas. Isso indica que com o passar do tempo, ocorreu um pequeno aumento do limiar nociceptivo.

O estudo realizado por Galdino, Duarte e Perez (2010), investigou a influência de diferentes protocolos de exercícios resistidos, com o uso de um modelo de levantamento de peso, sobre o limiar nociceptivo de ratas *Wistar* saudáveis, sendo que foi utilizado 2 protocolos, o primeiro consistia no animal realizar 15 séries de 15 repetições do exercício, e o segundo protocolo era de 3 séries de 10 repetições, ambos com carga de até 75% de uma repetição máxima, durante 12 semanas. Concluíram que, o exercício com maior intensidade, conseguiu aumentar o limiar nociceptivo dos animais. Esta pode ser uma explicação para a falta de resultados no limiar nociceptivo para o grupo que realizou a lesão associada ao exercício, no presente estudo, pois a intensidade de exercício aplicado pode ter sido muito leve.

Verificando a comparação entre os grupos, observa-se que os não lesionados mostraram resultados significativamente superiores aos lesionados. Entretanto o grupo controle, obteve um resultado inferior ao que fez somente exercício, mostrando que, apesar do exercício, não ter sido significativamente eficaz em promover aumento do limiar nociceptivo no GLE, o sedentarismo, representado em GC, também não é benéfico, visto que no GE, o exercício promoveu aumento do limiar nociceptivo. Ou seja, o exercício resistido de subida em escada, aumentou o limiar nociceptivo nos animais saudáveis, porém, não o suficiente para influenciar no grau de dor neuropática no grupo de animais lesionados e tratados.

Corroborando com estes achados, Mazzardo-Martins et al. (2010), estudaram o efeito hiponociceptivo do exercício de natação de alta intensidade, em um modelo químico de nocicepção e os mecanismos envolvidos neste efeito, em camundongos, e compararam com o grupo controle e com um grupo que havia associado o exercício ao uso de Naloxona. Observaram que o exercício de natação, produziu efeitos hiponociceptivos, por meio de uma maior liberação de opióides endógenos. Novamente confirmando que o exercício de alta intensidade, possivelmente seja o mais eficiente para estudos de dor.

Outro fator a ser destacado é o tempo que demorou para os animais serem reavaliados após o exercício, o que pode ter influenciado nos resultados do presente estudo. Segundo Galdino (2014), que avaliou a influência do exercício físico resistido de levantamento de peso em ratos *Wistar*, sendo 15 séries de 15 repetições com carga de 70% de 1RM, sobre a antinocicepção, e observou que o exercício foi eficaz, porém, seu efeito não foi duradouro. O limiar nociceptivo estimulado por pressão, aumentou imediatamente após 1 minuto de exercício resistido, regressando aos níveis basais após 15 minutos. Considerando que, no presente estudo não se priorizou reavaliar imediatamente após o exercício, este fato pode ter sido o fator responsável pela não eficácia do exercício proposto.

Em estudos em humanos, também já foi observado o efeito do exercício frente ao sintoma de dor. Hoffman et al. (2005), avaliaram se indivíduos com dor lombar crônica, obteriam analgesia induzida pela realização de exercício físico em bicicleta ergométrica por 25 minutos. E os resultados comprovaram analgesia frente a um estímulo de dor, posteriormente a realização do exercício físico. Concluindo que ao menos transitoriamente, o exercício aplicado teve um efeito positivo sobre a dor.

Com relação à análise histológica do nervo isquiático, foi possível observar que o modelo de lesão realizado neste estudo foi efetivo, pois causou alterações significativas no nervo isquiático dos animais. Contudo, o exercício físico resistido de subida em escada nos parâmetros propostos, não conseguiu acelerar o processo de regeneração de todas as fibras nervosas analisadas, mas algumas fibras do GLE mostraram-se com aspectos normais, semelhantes a GC, denotando uma leve melhora do tecido nervoso.

Corroborando com o presente estudo, Răducan et al. (2013), analisaram as características histológicas do nervo isquiático, 24 horas, quatro dias, duas semanas e quatro semanas após a lesão deste nervo por esmagamento, e constataram que 24 horas após a lesão, não foi possível observar diferenças significativas na histologia do nervo. Contudo, as alterações mais evidentes causadas pela degeneração axonal, foram observadas após quatro dias da lesão e consistiram em inchaço axonal e desorganização de endoneuro, degradação da mielina e intensa presença de células fagocíticas. No entanto, em quatro semanas após a lesão, a maioria das fibras já estavam regeneradas, porém com bainha de mielina mais delgada, entretanto ainda havia algumas fibras degeneradas, indicando que o processo de regeneração estava incompleto. Pode-se então constatar que possivelmente somente 21 dias, que foi o tempo que durou o presente estudo, tenha sido pouco para analisar a regeneração do nervo, mas o processo

regenerativo estava ocorrendo, visto que foi possível observar algumas fibras nervosas regeneradas em GLE.

Nesta mesma temática, Sta et al., (2014) analisaram as relações entre parâmetros eletrofisiológicos, comportamentais e morfológicos do nervo isquiático de ratos após lesão por esmagamento, e observaram que os primeiros sinais de mielinização iniciam a partir do 21º PO, indicando que possivelmente fosse necessário um tempo maior de estudo, para registrar dados significativos com relação ao diâmetro da bainha de mielina.

Ilha et al. (2008), dentre outras variáveis, analisaram o efeito do exercício resistido de subida em escada, com inclinação de 80 graus, sobre a regeneração do nervo isquiático de ratos *Wistar*, iniciando após duas semanas de lesão e se prolongando por 5 semanas de lesão, utilizando sobrecarga que atingiu 250 gramas ao final do tratamento, e constataram, que mesmo com o estímulo do exercício físico, as fibras regeneradas apresentaram bainha de mielina mais delgada e espaços maiores dentro do endoneuro.

Sobre os resultados da análise morfométrica, foi observado no presente estudo, que não houve variação entre os grupos com relação à quantidade de axônios. Tal fato é visível nas imagens histológicas, as quais demonstram que, apesar do número de axônios não ter reduzido nos grupos lesionados, estas estruturas nervosas, eram menores e mais delgadas. Visto que os valores de diâmetro da fibra nervosa, do axônio e da bainha de mielina, foram significativamente menores nos grupos lesionados, denotando que a lesão, interfere na estrutura desses elementos e que o exercício físico aplicado não foi capaz de restaurar os padrões de normalidade.

Semelhando ao presente estudo, Teodori et al. (2011), aplicaram um protocolo de exercício resistido de natação, em ratos *Wistar*, submetidos à lesão compressiva do nervo isquiático, e verificaram que todos os grupos lesionados apresentaram duas a três vezes mais axônios do que os controles, e explicaram que isso se deve ao fato de que, após a lesão do nervo, cada broto de axônio gera vários ramos na direção dos órgãos alvo, aumentando o número de axônios e não, reduzindo. Além disso, também observaram que o DAX, DFN e a EBM nos animais lesionados e tratados foi menor comparado ao controle (somente fizeram exercício), assim como no presente estudo, e explicam que, axônios regenerados com um diâmetro reduzido são comumente encontrados após a lesão do nervo periférico e estão associados a uma privação de conexões de terminais durante a regeneração, aumento do colágeno e retração do endoneuro.

No estudo de Ilha et al. (2008), também foram avaliados dados morfométricos, frente ao uso do exercício físico resistido de subida em escada, sobre a regeneração do

nervo isquiático de ratos *Wistar*, e constataram que, o grupo que realizou o tratamento com exercício, obteve médias de DFN, DAX e a EBM inferiores ao grupo controle, confirmando o encontrado no presente estudo.

Em estudos morfométricos de nervos periféricos, a espessura da bainha de mielina é expressa em valor absoluto, em micrômetros, ou por meio da razão entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da fibra nervosa, denominado de "razão G" ou quociente G, o qual define a espessura da bainha de mielina como adequada ao diâmetro axonal, quando o valor de sua razão G situa-se entre 0,65 e 0,80, apresentando então, velocidade de condução nervosa normal. Valores acima de 0,8 indicam bainha de mielina fina, enquanto aqueles abaixo de 0,65 indicam bainha de mielina espessa (Schmidt & Bear, 1937).

Com relação ao quociente G, no presente estudo, somente foi observado diferença significativa, comparando GC com os demais grupos, sendo que GC, apresentou média mais próximo de 0,6. Diferentemente do presente estudo, Ilha et al. (2008), observaram que o quociente G, nos grupos tratados com exercício resistido de subida em escada, apresentavam valores altos, indicando atraso na regeneração axonal e menor velocidade de condução nervosa.

Por fim, quando avaliado, a ocorrência de NGF e BDNF em amostras de nervos de cada grupo, e observou-se que o BDNF apresentou resultado significativo, sendo maior em GL e GLE. Este dado está de acordo com Grinsell e Keating (2014), os quais relatam que estes fatores neurotróficos, se fazem presentes após a ocorrência da lesão nervosa. Contudo, o fato de não ter sido encontrado diferença significativa com relação ao NGF, pode estar relacionado com o momento de avaliação desses fatores de crescimento, visto que a maior expressão destes, ocorre em torno do terceiro dia após a lesão. Berchtold et al. (2005) submeteram ratos *Sprague-Dawley* a realizarem exercício em esteira por 4 semanas, e avaliaram a expressão do BDNF no SNC destes animais. Verificaram que o exercício aumentou os níveis de BDNF no hipocampo desses animais comparado ao grupo controle. Apesar de no presente estudo os níveis de BDNF estarem aumentados em GLE, não foi o suficiente para proporcionar regeneração de todas as fibras nervosas.

Como limitações do presente estudo, destaca-se que foi estabelecido apenas uma sobrecarga a qual não foi aumentada conforme o peso corporal do animal, mas sim, estabelecida igual para todos. E além disso, a avaliação da nocicepção ocorreu cerca de 20 minutos após a realização do exercício.

Conclui-se com este estudo que o exercício resistido de subida em escada, nos parâmetros propostos não foi eficaz para acelerar o processo de regeneração nervosa.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

Albornoz, P. M., Delgado, P. J., Forriol, F., Maffulli, N. (2011). Non-surgical therapies for peripheral nerve injury. *British Medical Bulletin*, 100, 1–28.

Berchtold, N. C., Chinn, G., Chou, M., Kessler, J. P., Cotman, C. W. (2005). Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 133, 853-861.

Boeltz, T., Ireland, M., Mathis, K., Nicolini, J., Poplavski, K., Rose, S. J., Wilson, E., English, A. W. (2013). Effects of treadmill training on functional recovery following peripheral nerve injury in rats. *J Neurophysiol*, 109, 2645–2657.

Bridge, P. M., Ball, D. J., Mackinnon, S. E., Nakao, Y., Brandt, K., Hunter, D. A., Hertl C. (1994). Nerve Crush Injuries – A model for Axonotmesis. *Experimental neurology. Supplement*, 127, 84-90.

Di Scipio, F., Raimondo, S., Tos, P., Geuna, S. (2008). A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microscopy research and technique*, 71, 497-502.

English, A. W., Wilhelm, J. C., Sabatier, M. J. (2011) Enhancing recovery from peripheral nerve injury using treadmill training. *Ann Anat*, 193, 354-361.

Eser, F., Aktekin, L. A., Bodur, H., Atan, Ç. (2009). Etiological factors of traumatic Peripheral nerve injuries. *Neurology India*, 57, 434-437.

Faroni, A., Mobasser, A. S., Kingham, P. J., Reid, A. J. (2015). Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 82, 160–167.

Gaffuri, J., Meireles, A., Rocha, B. P., Rosa, C. T., Artifon, E. L., Silva, L. I., Moreira N. B., Bertolini, G. R. F. (2011). Avaliação do Exercício Físico Como Fator de Analgesia em Um Modelo Experimental de Cialgia. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 17, 115-118.

Galdino, G. S., Duarte, I. D. G., Perez, A. C. (2010). Participation of endogenous opioids in the antinociception induced by resistance exercise in rats. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 43, 906-909.

Galdino, G. (2014). Acute Resistance Exercise Induces Antinociception by Activation of the Endocannabinoid System in Rats. *Anesthesia and analgesia*, 119, 702–715.

Geuna, S., Tos, P., Guglielmone, R., Battiston, B., Giacobini-Robecchi, M. G. (2001). Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. *Anat Embryol*, 204, 1–10.

Grinsell, D., & Keating, C. P. (2014). Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *BioMed Research International*, 1, 1-13.

Hoffman, M. D., Shepanski, M. A., Mackenzie, S. P., Clifford, P. S. (2005). Experimentally induced pain perception is acutely reduced by aerobic exercise in people with chronic low back pain. *Journal of Rehabilitation Research e Development*, 42, 183-190.

Hornberger, T. A., & Farrar, R. P. (2004). Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian journal of applied physiology*, 29, 16-31.

Ilha, J., Araujo, R. T., Malysz, T., Hermel, E. E. S., Rigon, P., Xavier, L. L., Achaval, M. (2008). Endurance and Resistance Exercise Training Programs Elicit Specific Effects on Sciatic Nerve Regeneration After Experimental Traumatic Lesion in Rats. *Neurorehabil Neural Repair*, 22, 355-366.

Junqueira, L. C., & Carneiro, J. *Histologia Básica: Texto e Atlas*. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Kim DH, Murovic JA, Tiel R, Kline DG. (2004). Management and outcomes in 353 surgically treated sciatic nerve lesions. *Journal of neurosurgery*, 101, 8–17.

Mazzardo-Martins, L., Martins, D. F., Marcon, R., Santos, U. D., Speckhann, B., Gadotti, V. M., Sigwalt, A. R., Guglielmo, L. G. A., Santos, A. R. S. (2010). High-Intensity Extended Swimming Exercise Reduces Pain-Related Behavior in Mice: Involvement of Endogenous Opioids and the Serotonergic System. *Journal of Pain*, 11, 1384-1393.

Mazzer, P. Y. C. N., Barbieri, C. H., Mazzer, N., Fazan, V. P. S. (2008). Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. *Journal of neuroscience methods*, 173, 249–258.

Răducan, A., Mirică, S., Duicu, O., Răducan, S., Muntean, D., Fira-mlădinescu, O., Lighezan, R. (2013). Morphological and functional aspects of sciatic nerve regeneration after crush injury. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 54,735–739.

Ruiter, G. C. W., Spinner, R. J., Verhaagen, J., Malessy, M. J. A. (2014). Misdirection and guidance of regenerating axons after experimental nerve injury and repair. *Journal of Neurosurgery*, 120, 493–501.

Saadat, S., Eslami, V., Rahimi-Movaghar, V. (2011). The incidence of peripheral nerve injury in trauma patients in Iran. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 17, 539-544.

Schmidt, F. O., & Bear, R.S. (1937). The optical properties of vertebrate nerve axons as related to fiber size. *Journal Cell Comparative Physiology*, 9, 261-73.

Stagg, N. J., Mata, H. P., Ibrahim, M. M., Henriksen, E. J., Porreca, F., Vanderah, T. W (2011). Philip Malan Jr T. Regular Exercise Reverses Sensory Hypersensitivity in a Rat Neuropathic Pain Model. *Anesthesiology*, 114, 940-948.

Sta, M., Cappaert, N. L. M., Ramekers, D., Baas, F., Wadman, W. J. (2014). The functional and morphological characteristics of sciatic nerve degeneration and regeneration after crush injury in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 222, 189–198.

Teodori, R. M., Betini, J., OliveirA, L. S., Sobral, L. L., Takeda, S. Y., Montebelo, M. I. L. (2011). Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. *Neural Plasticity*, Patrington, 2011. 1-9.

Vivancos, G. G., Verri Jr, W. A., Cunha, T. M., Schivo, I. R. S., Parada, C. A., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. (2004). *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 37, 391-399.

Tabela 1. Dados referentes a alodínia na região plantar, do membro posterior direito dos animais, submetidos ou não ao exercício resistido de subida em escada (média ± desvio padrão em gramas).

AVALIAÇÕES	GRUPOS			
	CONTROLE (GC)	EXERCÍCIO (GE)	LESÃO (GL)	TRATADO (GLE)
AV1•	62,99±15,69	81,33±23,31	66,52±6,33	70,04±19,21
AV2	50,55±8,21	59,45±16,03	33,00±11,75	28,25±8,68
AV3	48,50±13,10	52,45±19,40	26,47±9,36	29,95±15,04
AV4••	42,94±12,02	50,79±10,29	27,95±9,77	19,50±5,85
AV5	52,05±11,97	61,04±10,75	22,09±9,14	25,05±9,60
AV6	59,50±11,00	50,87±15,17	31,28±7,30	25,33±7,01
AV7	49,44±12,36	59,41±6,49	45,57±15,71	29,00±15,63
AV8	45,94±14,71	65,58±10,21	51,71±14,08	28,33±7,01
MÉDIA	51,48±12,38	60,11±13,95*	38,07±10,43**	31,93±11,32**

(•) Diferença significativa comparada as demais avaliações; (••) diferença significativa comparada a AV7 e AV8; (*) diferença significativa comparada somente com G1; (**) diferença significativa comparada com G1 e G2, considerando $p < 0,005$.

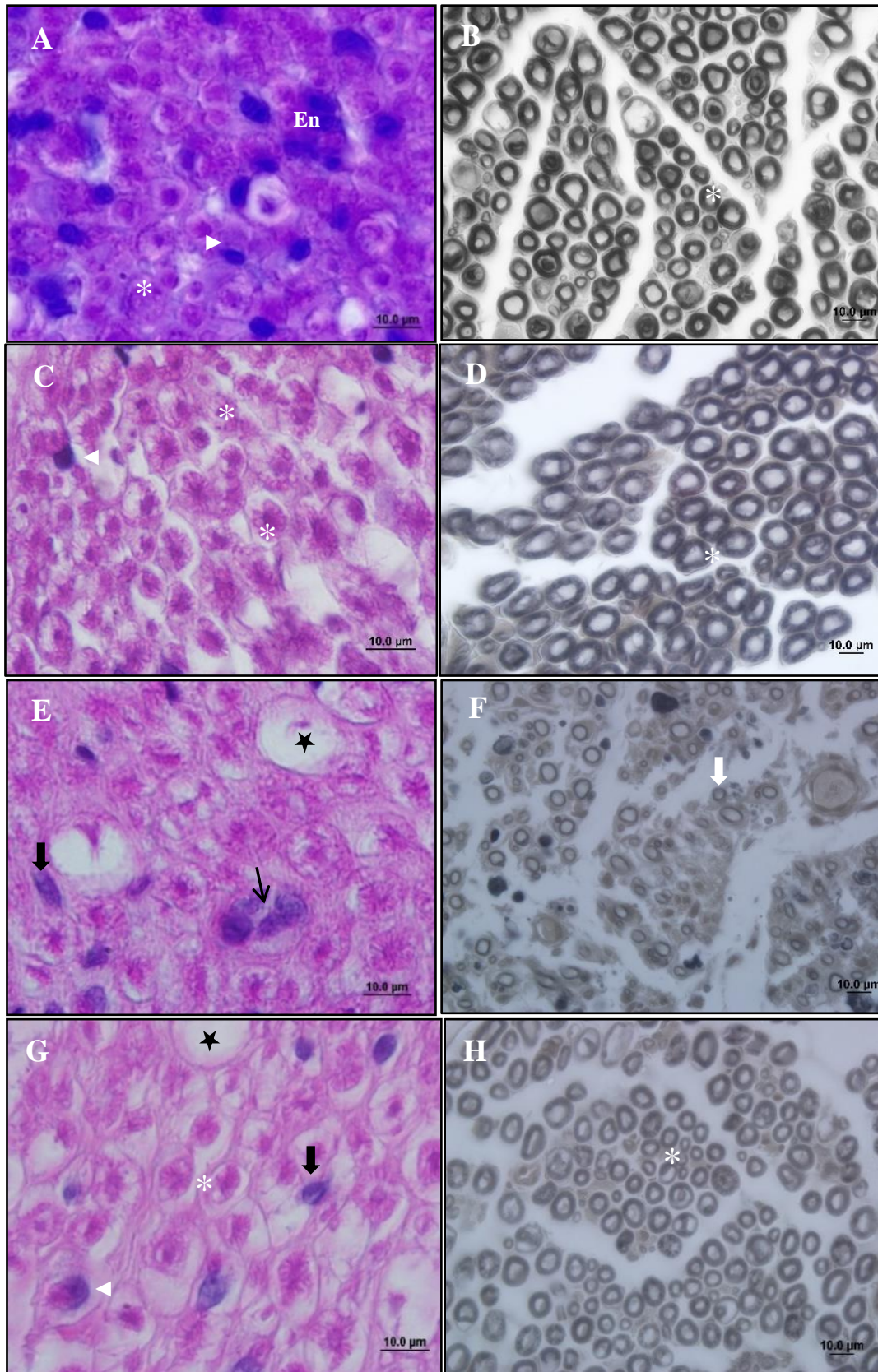


Figura 1. Fotomicrografias do nervo isquiático de ratos *Wistar* em corte transversal, sendo que a 1ª coluna as imagens estão coradas com Hematoxilina e Eosina e a 2ª coluna com tetróxido de ósmio. **A e B**, grupo controle com fibras nervosa íntegras (*), envoltas pelo endoneuro (En) e presença de núcleos de células de Schwann (ponta de seta). Em **C e D**, grupo exercício, em que se nota as mesmas características do grupo controle. **E e F**, grupo lesão, nota-se a presença de inúmeras fibras nervosas degeneradas (estrela), infiltrado inflamatório com macrófagos (seta grossa preta), aglomerados de células gigantes (seta fina preta), sendo que em F, visualiza-se a bainha de mielina bem delgada (seta grossa branca). Em **G e H**, grupo lesão e exercício, observa-se fibras nervosas degeneradas (estrela), núcleo de célula de Schwann (ponta de seta branca), infiltrado inflamatório (seta grossa preta) mas um grande número de fibras com aspecto normal (*).

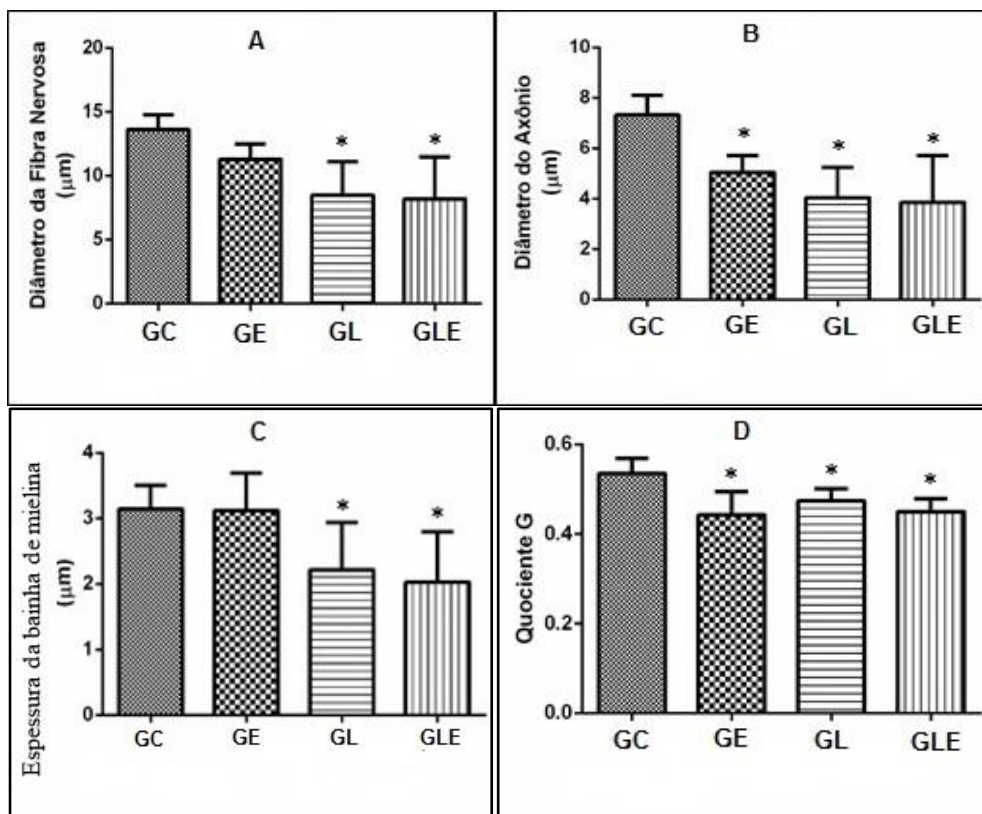


Figura 2. Representação gráfica dos resultados referentes a morfometria. (A), diâmetro da fibra nervosa, que foi menor nos grupos lesionados; (B) diâmetro do axônio, foi menor no grupo somente exercitado e nos lesionados; (C) espessura da bainha de mielina, que também foi menor nos grupos lesionaods e (D) quociente G – diâmetro do axônio/espessura da bainha de mielina, foi maior no grupo controle em relação aos demais. (*) diferença significativa considerando $p < 0,005$.

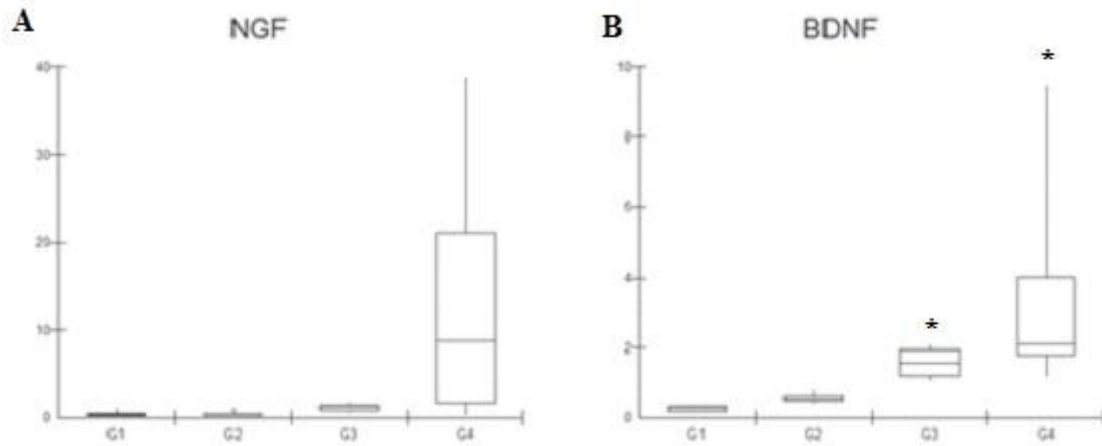


Figura 3. Gráfico representando os resultados da análise molecular. Em (A), fator de crescimento neural (NGF), em que não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Em (B), fator de crescimento derivado do encéfalo, destacando que GL e GLE obtiveram valores maiores e significativos de BDNF comparados a GC. (*) diferença significativa considerando $p < 0,005$.

APÊNDICE B

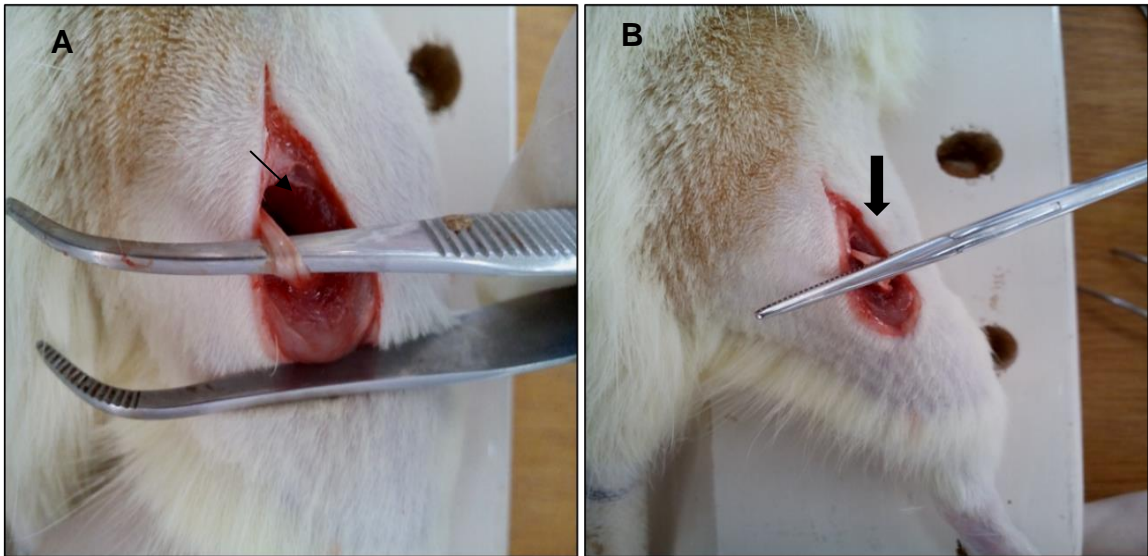


Figura 1 - Fotografias da apresentação e compressão do nervo isquiático. Em (A), exposição do nervo isquiático direito (seta fina preta). Em (B), nervo isquiático direito sendo comprimido com uso de pinça hemostática (seta grossa preta).



Figura 2. Representação da escada e do animal realizando o exercício resistido de subida de escada.

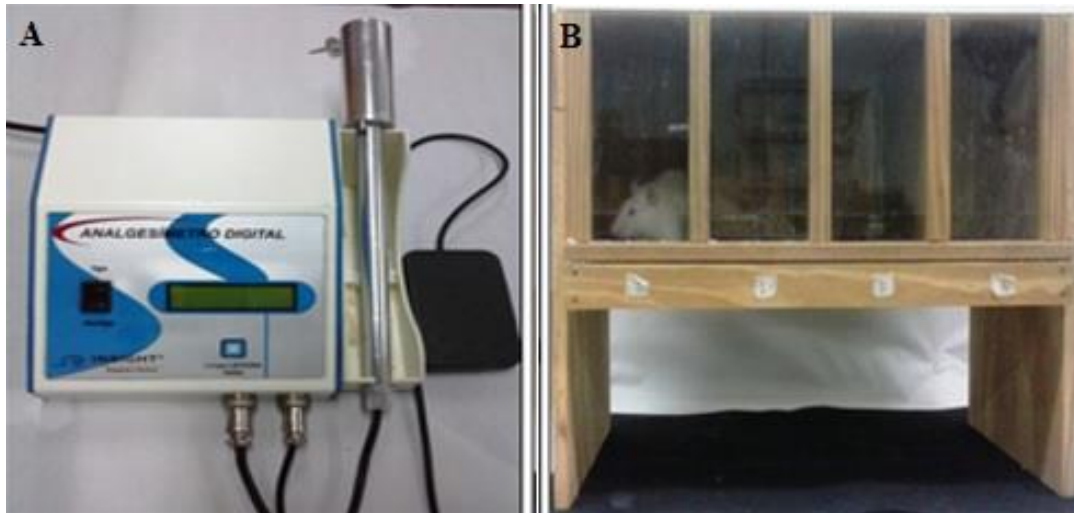


Figura 3. Avaliação da nocicepção. Em (A), equipamento de analgesímetro digital, do tipo filamento de Von Frey, utilizado para a avaliação da nocicepção. Em (B), caixa de madeira elevada, para avaliação da nocicepção na região plantar direita do animal.

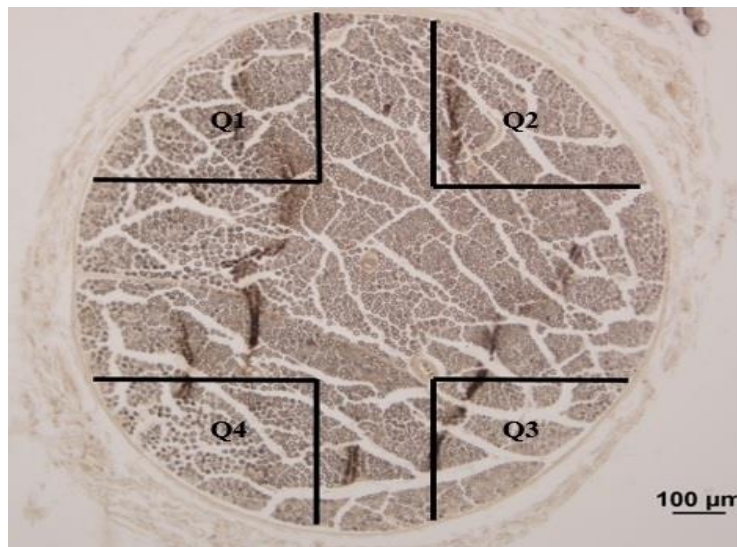


Figura 4. Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático direito, do grupo controle, em objetiva de 100x, ilustrando a divisão da imagem em 4 quadrantes para realização da morfometria.

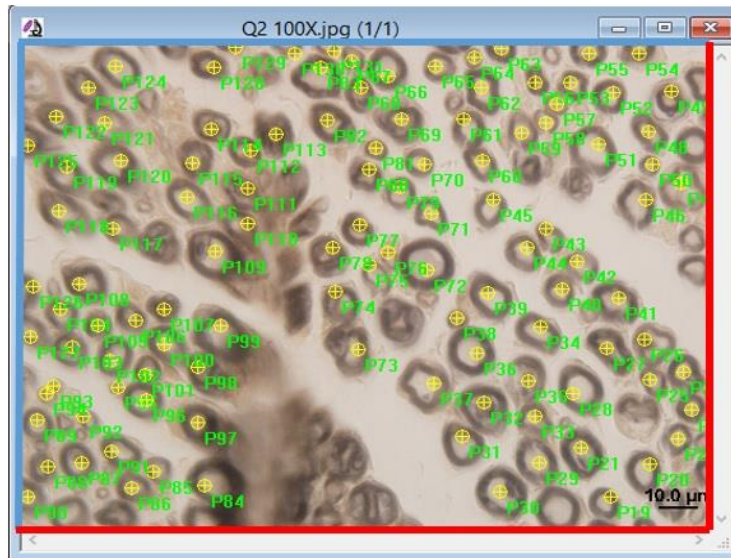


Figura 5. Fotomicrografia do corte transversal do nervo isquiático direito, do grupo controle, em objetiva de 100x, para ilustração das bordas de inclusão (azul) e bordas de exclusão (vermelha), utilizadas para padronizar a contagem dos axônios.

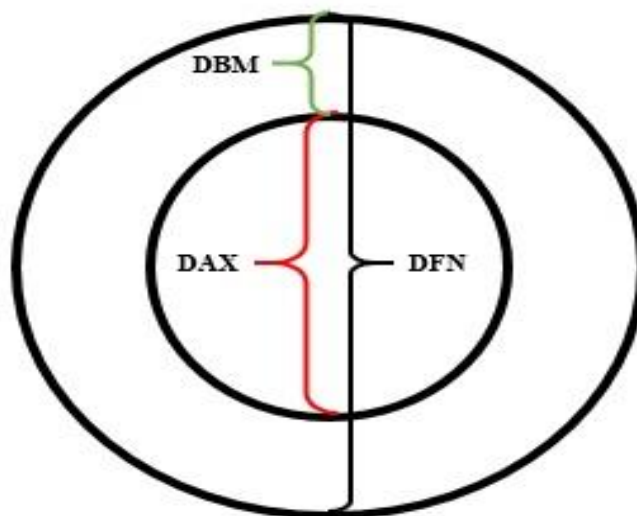


Figura 6. Imagem ilustrativa de como foi realizado as medidas dos diâmetros do axônio (DAX), da bainha de mielina (DBM) e da fibra nervosa (DFN).

1. ANEXOS

7.1 ANEXO 1

Parecer de aprovação do comitê de ética em animais



PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Avaliação do exercício resistido, associado ou não a Vanilina, em modelo experimental de compressão do nervo isquiático", 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, 11/04/2014

Dirceu Baumgartner
Coordenador do CEUA
Portaria no 1130/2014-GRE

7.2 ANEXO 2

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA SCIENTIA MEDICA

Solicita-se aos autores que leiam todas as instruções abaixo antes de preparar o artigo e antes de iniciar o processo de submissão. Somente serão encaminhados aos revisores os manuscritos que estejam rigorosamente de acordo com as normas especificadas.

As submissões somente poderão ser feitas pela Internet. Neste documento estão as instruções para submissão *online*, as quais também devem ser cuidadosamente seguidas.

Normas de publicação

A Scientia Medica segue as linhas gerais das Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals: <http://www.icmje.org/recommendations/>

Políticas editoriais

Os autores são convidados a consultar as políticas editoriais da Scientia Medica, no menu sobre, para informar-se sobre foco e escopo, tipos de artigos, avaliação por pares, declaração de conflito de interesses e outras políticas. <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/about/editorialPolicies>

Originalidade e ineditismo

- Ao submeter o manuscrito, os autores assumem a responsabilidade do trabalho não ter sido previamente publicado nem estar sendo analisado por outra revista.
- Não são aceitáveis cópias literais de trechos já publicados, a não ser em casos excepcionais, como citação (ver "regras para citações de textos na íntegra").
- A Scientia Medica utiliza *software* de identificação de similaridade: textos copiados serão identificados e o trabalho será devolvido aos autores.

Ética em pesquisa

Os artigos originais e os relatos de caso devem necessariamente ter seguido os princípios éticos da pesquisa em seres humanos (<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>) e ter passado pela aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa, devendo este fato ser referido claramente na descrição da metodologia. O número do documento de aprovação deve ser informado.

Se pertinente, informar que foi obtido consentimento livre e esclarecido de todos os participantes adultos ou, no caso de menores ou incapazes, de seus representantes legais.

Em caso de estudo experimental com animais, informar que a manutenção e o cuidado aos animais seguem as diretrizes da instituição ou do país para o uso de animais em pesquisa.

No momento da submissão, os autores assumem a responsabilidade de não utilizar dados falsos ou copiados.

Autoria

- Cada pessoa consignada como autor deve ter participado efetivamente do trabalho e assumir a responsabilidade pública pela parte do artigo com a qual contribuiu.
- O documento submetido deve ter sido cuidadosamente lido por todos os autores, que devem concordar com o seu conteúdo.
- Sobre direitos autorais, ver o item especial.
- <http://revistaseletronicas.pucrs.br/scientiamedica/ojs/index.php/scientiamedica/about/submissions#copyrightNotice>.

Preparação do artigo

Idioma

Os artigos podem ser redigidos em Português, Inglês ou Espanhol, sendo que a linguagem científica requer um estilo claro, simples e conciso.

Documentos que devem ser submetidos

Pelo menos dois arquivos devem ser transferidos: uma folha de rosto e o documento principal. Abaixo as instruções para a preparação e formatação dos mesmos.

Folha de rosto

Fazer download do modelo que se encontra disponível em: <http://ebooks.pucrs.br/edipucrs/periodicos/ScientiaMedica/folhaderosto.docx>

Preencher conforme as instruções e fazer upload do documento no momento da submissão, como documento suplementar.

Atenção: o preenchimento da folha de rosto não isenta o autor que faz a submissão de preencher completamente os metadados na página eletrônica, sendo muito importante informar na página eletrônica os nomes completos de todos os autores e os respectivos e-mails, válidos.

A folha de rosto não será disponibilizada aos revisores, pois a Scientia Medica utiliza o sistema de avaliação por pares duplo-cego: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/about/editorialPolicies#peerReviewProcess>.

Documento principal

Organização do artigo e outras regras de publicação

A ordem das seções é a seguinte para todos os tipos de artigo: Resumo, Descritores, Abstract, Key Words, Texto principal, Agradecimentos (se houver), Referências, Tabelas (se houver), Figuras (se houver). Observar na tabela abaixo a divisão de cada seção conforme o tipo de artigo. Detalhes sobre a preparação de cada um desses itens encontram-se em "Elementos textuais". Os títulos e subtítulos não devem ser numerados.

Números de um a nove devem ser escritos por extenso, a não ser quando seguidos por unidade de medida ou quando compondo uma série. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Medidas. Termos estrangeiros e nomes de microrganismos e de espécies animais ou vegetais devem ser escritos em *italico*. Podem ser usadas siglas de termos compostos, ou abreviaturas, se o termo aparecer pelo menos cinco vezes no texto. Na primeira citação, o termo deve ser escrito por extenso, seguido da sigla ou abreviatura entre parêntesis.

Não usar as siglas nem abreviaturas nos resumos e abstracts. Na citação de marcas comerciais informar o nome do fabricante e o local de fabricação (cidade, país), entre parêntesis.

Formatação do documento principal

Os originais devem ser digitados em formato Word (Microsoft Office), em página tamanho A4 e margens de 2,5 cm. O tamanho de cada documento não deve ultrapassar 2 MB.

De preferência usar o recurso "Estilo" do Word. Aplicar o estilo "Normal" em todo o documento. Para configurá-lo, clicar com o botão direito do mouse em "Normal" e com o botão esquerdo clicar em "Modificar". Escolher as seguintes configurações:

- Fonte: Times New Roman 12.
- Parágrafo: alinhamento justificado; recuo de primeira linha por 1,25 cm; sem nenhum espaçamento antes ou depois; espaçamento entre linhas duplo.
- Não usar espaço ou tabulação para criar recuo na primeira linha, usar apenas a configuração do parágrafo.

Formatação das referências e tabelas

As referências podem ser numeradas manualmente ou utilizando a lista de marcadores numerados do Word ou, ainda, um *software* gerenciador de referências.

As tabelas são melhor visualizadas com alinhamento à esquerda, sem nenhum recuo de primeira linha e com espaçamento simples entre as linhas. Selecionar cada tabela e aplicar essas configurações.

Elementos textuais

Resumo e Abstract

Deve haver uma versão do resumo em Português (ou em Espanhol, se o texto principal for nesse idioma) e outra em Inglês (Abstract), com até 300 palavras cada uma. Ambas as versões devem ter exatamente o mesmo conteúdo. Todas as informações que aparecem no

Resumo e no Abstract devem aparecer também no texto principal. O Resumo e o Abstract devem ser estruturados.

Descritores (indexadores ou palavras chave) e Key Words:

Descritores são termos utilizados na indexação do artigo para que seja localizado, por assunto, por mecanismos de pesquisa eletrônica. O preenchimento correto dos descritores é fundamental para que sua publicação seja facilmente encontrada por outros pesquisadores. A Scientia Medica utiliza como palavras chaves os Descritores em Ciência da Saúde (DeCs), disponíveis pela BIREME/OPAS/OMS, no endereço <http://decs.bvs.br>.

Texto

Deve ser dividido em subtítulos, de acordo com o tipo de artigo (conforme a tabela abaixo). Nos Artigos originais, a Scientia Medica não aceita que os resultados e a discussão sejam combinados no mesmo subtítulo. Já as conclusões não devem constituir um item separado, sendo colocadas como último parágrafo da discussão. Ao contrário, nos artigos de revisão, as conclusões podem constituir o último subtítulo, que pode ser alternativamente denominado de discussão ou considerações finais. Os subtítulos não devem ser numerados em nenhum dos tipos de artigo.

Para a definição de cada tipo de artigo e outras normas específicas, consultar as Políticas de Seção:

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/scientiamedica/ojs/index.php/scientiamedica/about/editorialPolicies#sectionPolicies>

Ver também as normas específicas para Artigos de Revisão

<http://ebooks.pucrs.br/edipucrs/periodicos/ScientiaMedica/revisao.pdf>

Agradecimentos

Devem ser breves e objetivos, apresentados no final do texto (antes das referências), incluindo somente as pessoas ou instituições que contribuíram para o estudo.

Tabelas

As tabelas com suas legendas devem ser apresentadas no formato do Word (Microsoft Office). No manuscrito original elas devem ser colocadas páginas.

Todas as tabelas (assim como as figuras) devem ser numeradas na ordem de aparecimento no texto e devem ser citadas no mesmo. A legenda deve aparecer em sua parte superior, precedida pela palavra "Tabela", seguida do número de ordem de ocorrência no texto, em algarismos arábicos (ex: Tabela 1, Tabela 2, etc).

As legendas das tabelas devem ser auto-explicativas, de forma que as tabelas sejam compreendidas dispensando consulta ao texto. Explicações mais detalhadas ou específicas devem ser apresentadas em notas de rodapé, identificadas por símbolos na seguinte sequência: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡. Devem constar, de preferência, informações do tratamento estatístico. Não sublinhar ou desenhar linhas dentro das tabelas e não usar espaços para separar colunas. Não usar espaço em qualquer lado do símbolo ±.

Ao contrário do restante do texto, as tabelas devem ser formatadas sem recuo de primeira linha e com espaçamento entre linhas simples.

Figuras

As figuras compreendem gráficos, desenhos, fluxogramas, fotografias, etc. Dá-se preferência a figuras originais, produzidas pelos próprios autores. Em caso de figura já publicada anteriormente, seja dos próprios autores ou de autoria de terceiros, os autores deverão indicar a fonte original na legenda e providenciar uma carta de permissão do detentor dos direitos autorais (editora, revista ou autor), sem a qual a figura não poderá ser reproduzida na Scientia Medica. Essa carta de permissão pode ser enviada quando a primeira revisão do artigo pelos autores for submetida.

Todas as figuras devem ser numeradas na ordem de aparecimento no texto, em números arábicos (Figura 1, Figura 2, etc.) sendo que o texto deve conter a indicação de cada uma. As figuras são colocadas após as tabelas, no final do documento, com as respectivas numerações e as legendas em sua parte inferior. As legendas devem ser sucintas, porém autoexplicativas, com informações claras, de forma a dispensar consulta ao texto.

As figuras produzidas em arquivo de texto, como gráficos e fluxogramas em Word ou Excel, devem ser enviadas na forma original como foram produzidas, ou seja, de maneira que possam ser editadas.

Fotografias e algumas imagens complexas devem ser enviadas sob forma de arquivos de imagem (de preferência em formato JPG) com resolução mínima de 300 dpi, para que sejam melhor visualizadas na página eletrônica, embora sem exceder 2 MB. Assim como a Folha de Rosto, os arquivos de imagem devem ser transferidos como "Documento Suplementar", no local apropriado. As legendas das figuras enviadas como anexo devem ser colocadas, com a respectiva numeração, no final do texto principal do artigo, após as referências, e também nos metadados do documento suplementar, conforme as instruções que são dadas no momento da submissão.

Referências

Todas as referências citadas no texto e apenas estas, devem aparecer na lista de referências. A numeração da lista segue a ordem de aparecimento no texto. Cada número deve aparecer após o texto correspondente, entre colchetes e antes da pontuação. Esta regra mudou em 2015. Para exemplos, pedimos consultar os artigos publicados a partir do volume 25 (2015). Quando a citação contiver mais de um número, separar cada número por vírgula. Mais de dois números seguidos, colocar somente o primeiro e o último, separados por hífen.

A lista de referências deve ser elaborada conforme o estilo *Vancouver*. Exemplos dos tipos de referências mais utilizados são apresentados a seguir. Solicita-se aos autores não colocar o DOI, que será acrescentado pela equipe editorial após.

Normas e exemplos também podem ser consultados através do site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>

(1) Nomes dos autores

- a. Citar todos os nomes, independentemente do número de autores.
- b. Sobrenome seguido pelas iniciais de prenome e nome (s) do meio, sem ponto.
- c. Cada autor separado por vírgula e no final com ponto.

(2) Título do artigo

- a. Somente primeira palavra iniciando em maiúscula (a não ser nomes próprios).
- b. Ponto no final e espaço.

(3) Título da revista

- a. Abreviado conforme as normas do Medline.
- b. Sem pontos no meio, apenas no final e espaço.

(4) Ano da publicação

- a. A *Scientia Medica* opta por não colocar o mês da publicação.
- b. Ponto e vírgula após o ano.
- c. Sem espaços entre ano, volume, fascículo e paginação.

(5) Volume

- a. Sem pontuação, seguido pelo parêntesis com o número do fascículo. Caso não tenha o número do fascículo, dois pontos são colocados logo após o volume.

(6) Fascículo

- a. Sempre que possível colocar o número do fascículo, entre parêntesis e com dois pontos após.

(7) Paginação em revista impressa

- a. Primeira e última páginas, separadas por hífen e terminando com ponto.
- b. Não repetir na última página os números que já estão na primeira página.

Exemplo: ao invés de 281-287 escrever 281-7.

(8) Paginação em revista apenas eletrônica

- a. De acordo com cada revista. Geralmente é colocado o número de página informado na publicação, precedido pela letra "e".

(9) DOI (*Digital Object Identifier*)

- a. Se a revista citada tiver edição eletrônica e o artigo citado tiver DOI, a equipe editorial colocará o mesmo após a referência completa. Pedem-se aos autores que somente coloquem o DOI se o artigo citado ainda estiver em publicação "*ahead of print*".

Artigo em periódico com edição impressa e eletrônica

Como no exemplo impresso.

Livro ou monografia – exemplos

Autor(es) pessoal(is):

Clotet, J. Bioética – uma aproximação. 2ª ed. Porto Alegre: Edipucrs; 2006.
(Indicação da edição (a primeira não se indica) sempre deve ser no idioma do livro - Se em português: 2ª, 3ª. Se em Inglês: 2nd, 3rd, 4th.)

Editor(es), compilador(es) como autor(es):

Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editors. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 7th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2011.

Capítulo de livro – exemplo:

Remington JS, McLeod R, Wilson CB, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editors. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 7th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2011. p. 918-1041.

Dissertação – exemplo

Silva MM. O sono da criança e a amamentação [dissertation]. [Porto Alegre]: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008. 134 p.

Tese – exemplo

Padoin, AV. Influência da zona doadora na concentração de células-tronco derivadas do tecido adiposo em mulheres [thesis]. [Porto Alegre]: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008. 53 p.

Para outros tipos de publicações, consultar <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>

Regras para citações de textos na íntegra:

Tanto nos artigos originais quanto nos artigos de revisão, devem ser evitadas citações literais, mesmo que acompanhadas pela referência do autor original. Não é aceitável que um texto seja escrito com base em citações literais. Em casos excepcionais, nos quais seja realmente necessário copiar as palavras de outro autor, utilizar as seguintes regras: após a citação do nome do autor, seguido pelo número da referência correspondente, um trecho de até 3 linhas pode ser colocado entre aspas. Trechos maiores precisam ser destacados com fonte dois pontos menor e parágrafo com recuo de 3 cm à esquerda.

Instruções para submissão online:

Para iniciar o processo de cadastro e submissão, entrar em <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/about/submissions>

A apresentação inicial por padrão da página eletrônica da Scientia Medica é no idioma Inglês. Para submeter um artigo em Português é importante selecionar o idioma Português no menu correspondente, para que os itens da submissão fiquem corretos. Se o artigo estiver em Inglês, a submissão poderá seguir na interface inicial.

O autor que faz a submissão precisa cadastrar-se no site, onde escolherá um nome de usuário e uma senha. Marcar a opção "Autor" na parte de baixo do formulário de cadastro, além de "Leitor", que já vem marcada. Uma vez cadastrado, poderá entrar no sistema a qualquer momento, com seu login e senha (em acesso, no menu superior da página eletrônica).

Automaticamente ao concluir o processo inicial de cadastro, ou quando uma pessoa previamente cadastrada entra com seu login e senha, o sistema remete para a "Página do Usuário", que lista as funções que a pessoa pode assumir na revista. Clicando na função de autor, aparece a lista de suas submissões ativas, e uma nova submissão pode ser iniciada.

O autor não precisa concluir os passos da submissão de uma vez só, podendo retomar a qualquer momento às submissões listadas como "incompletas", na lista de submissões ativas. É essencial seguir rigorosamente as instruções que irão aparecendo nos cinco passos da submissão.

Escolha da seção

No início da submissão, o autor escolhe a seção em que o artigo deve ser inserido. É muito importante que o autor se informe sobre as normas específicas para cada tipo de seção. Além das instruções já fornecidas nestas Diretrizes, informações sobre cada tipo de artigo estão no menu "Políticas de Seção":

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/scientiamedica/ojs/index.php/scientiamedica/about/editorialPolicies#sectionPolicies>

Escolha do idioma do documento principal

Deve ser marcado o idioma em que está redigido o texto principal. Em qualquer dos idiomas, sempre serão exigidos o Resumo (em Português) e o Abstract (resumo em Inglês), assim como os títulos nesses dois idiomas.

Condições de submissão

O autor que está fazendo a submissão terá que assinalar vários itens em que todos os autores assumem a responsabilidade de atender às normas e diretrizes da Scientia Medica. Os itens devem ser lidos com atenção e, se algum deles não estiver sendo observado, o autor deve interromper a submissão e tomar as devidas providências para que as condições sejam cumpridas.

Declaração de direito autoral

Os autores declaram aceitar a política de direito autoral praticada pela revista. A submissão de originais para a Scientia Medica implica na transferência, pelos autores, dos direitos de publicação impressa e digital. Os direitos autorais para os artigos publicados nesta revista são do autor, com direitos da revista sobre a primeira publicação. Os autores somente poderão utilizar os mesmos resultados em outras publicações indicando claramente a Scientia Medica como o meio da publicação original. Em virtude de tratar-se de um periódico de acesso aberto, é permitido o uso gratuito dos artigos, principalmente em aplicações educacionais e científicas, desde que citada a fonte. A Scientia Medica adota a licença Creative Commons *Attribution 4.0 International*: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>

Transferência do artigo

Procurar o documento principal no computador e transferi-lo.

Inclusão dos metadados

Os metadados precisam ser cuidadosamente preenchidos. Por favor, siga estas instruções.

Os nomes completos de TODOS os autores do artigo devem ser acrescentados no site da submissão, na mesma ordem em que aparecem na página de rosto, assim como seus endereços de e-mail, instituições de origem (denominadas de "afiliação"), títulos e funções. As titulações podem ser digitadas no campo "Resumo da Biografia". É muito importante que a pessoa que faz a submissão coloque endereços de e-mail válidos para todos os autores, no campo específico.

Inclusão dos metadados em Inglês

Ao terminar de preencher os dados em Português, clicar no menu "adicionar dados em outro idioma" (**não é o mesmo menu de escolha do idioma inicial de interface**), localizado na parte central superior da página dos metadados, escolher "English" e clicar em "submeter", para incluir o título, resumo e palavras chave em Inglês. Se o artigo for em Inglês e o autor que submete estiver trabalhando na página em Inglês, neste momento escolher o menu "Português (Brasil)" e incluir o título, resumo e palavras chave em Português.

Informar ao sistema o idioma em que o texto principal do documento está redigido. Se o artigo estiver escrito em Português, marcar "pt"; se estiver em Inglês, marcar "en"; em Espanhol, marcar "es". A identificação do idioma é importante para a indexação do artigo nas bases de dados e para que a interface apareça corretamente.

Transferência de documentos suplementares

A **folha de rosto**, preenchida conforme as instruções fornecidas nestas Diretrizes para Autores, deve ser transferida separadamente.

Se houver arquivos de imagem, conforme explicitado na página 4 deste documento, estes também devem ser transferidos como documentos suplementares. O sistema permite a inclusão de vários documentos.

Informação do issn da scientia medica no cv lattes e plataforma sucupira

Solicitamos aos autores que ao preencherem os dados de sua produção científica na Plataforma Lattes (CNPq) e na Plataforma Sucupira (CAPES), em relação às novas publicações, seja informado o ISSN 1980-6108 (eletrônico), pois a partir de 2015 a Scientia Medica passa a não ter mais edição impressa. Entretanto, para os artigos publicados anteriormente, continua válido o ISSN impresso.

7.3 ANEXO 3

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA PAIN RESEARCH AND MANAGEMENT

Language editing

Hindawi has partnered with Editage to provide an English-language editing service to authors prior to submission. Authors that wish to use this service will receive a 10% discount on all editing services provided by Editage. To find out more information or get a quote, please click [here](#).

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact prm@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author (s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to toprm@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

Pain Research and Management is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Pain Research and Management, please visit the Article Processing Charges information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., "as discussed by Smith [9]"; "as discussed elsewhere [9, 10]"). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interest, authors should state that "The author (s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper."

Clinical Study

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

Ethical Guidelines

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any experiments on humans, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work which carries a risk of harm to human subjects must include a statement that the experiment was conducted with the human subjects' understanding and consent, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors must provide a full description of any anesthetic or surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.