

DANIEL FERNANDES MARTINS

**MOBILIZAÇÃO NEURAL COMO RECURSO TERAPÊUTICO NA
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL E MORFOLÓGICA DO NERVO CIÁTICO DE
RATOS APÓS LESÃO TRAUMÁTICA**

Florianópolis

2009

DANIEL FERNANDES MARTINS

**MOBILIZAÇÃO NEURAL COMO RECURSO TERAPÊUTICO NA
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL E MORFOLÓGICA DO NERVO CIÁTICO DE
RATOS APÓS LESÃO TRAUMÁTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Cargnin Ferreira

Florianópolis

2009

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida.

Aos meus pais, e meus irmãos, pelo grande e constante incentivo e pela oportunidade que me proporcionaram na realização deste estudo.

À minha namorada Leidiane que prestou auxílio indispensável a este trabalho, compartilhando os momentos de alegria e tristeza.

Ao professor Dr. Adair Roberto Soares dos santos, por proporcionar momentos impagáveis de conhecimento. Meus sinceros agradecimentos por oferecer, além de sua amizade, uma excelente orientação, incentivo e dedicação.

Aos meus colegas, alunos da UFSC, pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

À todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

IFC/SFC	Índice Funcional do Ciático/ <i>Sciatic Functional Index</i>
IEC/SSI	Índice Estático do Ciático/ <i>Sciatic Static Index</i>
MN1d	Mobilização neural a partir do 1º dia após esmagamento
MN5d	Mobilização neural a partir do 5º dia após esmagamento
MN10d	Mobilização neural a partir do 10º dia após esmagamento
PL	“Print Length” ou Comprimento da pegada
TS	“Total Spread” ou Abertura total dos dedos do 1º ao 5º
IT	“Intermediate Toes” ou Abertura dos dedos intermediários do 2º ao 4º
N	Normal
E	Experimental
EPE/SLR	Elevação da perna estendida/ <i>Straight Leg Raise</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Componentes estruturais dos nervos.....	14
Figura 2	Estresse físico aplicado sobre o nervo.....	15
Figura 3	Diagrama de um nervo paralelo em uma articulação em diferentes posições.....	16
Figura 4	Estados de estresse físico contínuo.....	17
Figura 5	Comparação classificações das lesões do sistema nervoso periférico	18
Figura 6	Desenho esquemático dos principais eventos da degeneração e regeneração após lesão nervosa periférica.....	20
Figura 7	Marcação do local do esmagamento com fio de sutura (seta branca).....	28
Figura 8	Pinça utilizada para realizar o esmagamento.....	29
Figura 9	Modelo do aparato utilizado para realizar o posicionamento do membro posterior do animal e subsequente tratamento com mobilização neural..	30
Figura 10	Linha indicando os dias dos procedimentos experimentais.....	31
Figura 11	Pista utilizada para obtenção das imagens da vista inferior dos animais..	31
Figura 12	Imagens da vista inferior do animal.....	32
Figura 13	Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o índice funcional do ciático (IFC).....	33
Figura 14	Aplicação do filamento de von Frey.....	35
Figura 15	Aplicação da acetona.....	36
Figura 16	Imagens da análise morfométrica das secções transversa do nervo ciático de ratos.....	40
Figura 17	Efeito da mobilização neural sobre recuperação funcional motora avaliada através do (IFC).....	43
Figura 18	Efeito da mobilização neural sobre recuperação funcional motora avaliada através do (IEC).....	44
Figura 19	Efeito da mobilização neural sobre a alodinia mecânica	45
Figura 20	Efeito da mobilização neural sobre a alodinia ao frio.....	46
Figura 21	Imagens de secções transversas da porção distal do nervo ciático de ratos.....	49
Figura 22	Efeito da mobilização neural sobre os parâmetros morfométricos da regeneração das fibras nervosas.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Anatomia funcional e organização estrutural do nervo.....	12
1.2	Movimentos das articulações e estresse físico.....	15
1.3	Respostas fisiológicas ao estresse físico dos nervos.....	16
1.4	Lesões dos nervos e degeneração Walleriana.....	17
1.5	Avaliações da função motora.....	20
1.6	Dor neuropática periférica.....	21
1.7	Mobilização neural.....	23
1.7.1	Teste de elevação da perna estendida (TEPE).....	24
1.7.2	Técnicas de mobilização neural (tensionamentos neurodinâmicos).....	25
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	Objetivo Geral.....	26
2.2	Objetivos Específicos.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	Animais e grupos experimentais.....	27
3.2	Procedimento cirúrgico.....	28
3.3	Tratamento com mobilização neural.....	29
3.4	Avaliação da recuperação funcional sensório-motora.....	30
3.4.1	Coleta e análise das imagens.....	31
3.4.1.1	Pista de análise da marcha.....	31
3.4.1.2	Obtenção e análise das imagens.....	32
3.4.2	Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático do Ciático (IEC).....	32
3.4.3	Avaliação da função sensorial (parâmetros experimentais relacionados à dor)..	34
3.4.3.1	Alodinia mecânica (von Frey).....	34
3.4.3.2	Alodinia ao frio (acetona).....	35
3.4.4	Análise histológica e morfométrica.....	36
3.4.4.1	Preparação das amostras.....	36
3.4.4.2	Técnicas histomorfológicas.....	37
3.4.4.3	Tratamento das imagens.....	38
3.4.4.4	Morfometria.....	38

3.4.4.5	Controle de qualidade.....	39
3.5	Análise estatística.....	41
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Efeito da mobilização neural sobre a recuperação funcional motora através do Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático do Ciático (IEC).....	42
4.2	Efeito da mobilização neural sobre a recuperação funcional sensória através da avaliação da alodinia mecânica e ao frio.....	42
4.3	Análise histológica e morfométrica	47
5	DISCUSSÃO.....	51
5.1	Recuperação funcional motora.....	51
5.2	Recuperação funcional sensorial.....	52
5.3	Análise histológica e morfométrica.....	53
5.4	Mobilização neural e degeneração Walleriana.....	54
6	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

RESUMO

O presente estudo examinou os efeitos do tratamento com Mobilização Neural (MN) na recuperação funcional sensório-motora após esmagamento do nervo ciático de ratos. O esmagamento foi realizado em ratos machos, adultos, submetidos a 15 sessões de MN passiva; através do Teste de Elevação da Perna Estendida modificado, com os grupos começando em 3 diferentes tempos: 1, 5 e 10 dias (MN1d, MN5d, MN10d) após a lesão por esmagamento do nervo. Durante o período de tratamento, a recuperação sensório-motora foi monitorada semanalmente, usando o Índice Funcional do Ciático (IFC), o Índice Estático do Ciático (IEC) e os testes de von Frey e da acetona. No final do tratamento, foram realizadas análises histológicas e morfométricas para avaliar a regeneração do nervo ciático. Os resultados mostraram que o tratamento com MN precoce (MN1d) foi capaz de acelerar o processo de regeneração do nervo ciático, além de reduzir a resposta nociceptiva (alodinia mecânica). Com relação aos tratamentos tardios (MN5d e MN10d), estes grupos tiveram somente redução da resposta nociceptiva produzida pela lesão do nervo e não foram observadas mudanças na função motora. Na porção distal do nervo ciático, o grupo MN1d apresentou um aumento da espessura da bainha de mielina, além disso, o grupo MN5d mostrou uma maior densidade de fibras mielinizadas. Estes dados fornecem evidência de que o tratamento com MN precoce induziu dois efeitos benéficos: aumento da recuperação funcional e redução da alodinia mecânica, entretanto, o tratamento tardio (MN5d e MN10d) teve efeito somente na redução da resposta nociceptiva à estimulação mecânica.

Palavras-chaves: Mobilização Neural, mobilização precoce, ratos, regeneração do nervo ciático, recuperação funcional, dor neuropática, fisioterapia.

ABSTRACT

The present study examined the effects of Neural Mobilization (NM) in the functional sensory-motor recovery after sciatic nerve crush injury in rats. The nerve crush was performed on adult male rats, submitted to 15 sessions of passive neural mobilization treatment through a modified straight leg raise (SLR) test, with groups starting at 3 different times: 1, 5 and 10 days (NM1d, MN5d, MN10d) after nerve crush injury. Over the treatment period, sensory-motor recovery was monitored weekly using the Sciatic Functional Index (SFI), Static Sciatic Index (SSI), von Frey and acetone drop tests. Histological and morphometric nerve analyses were performed, at the end of the treatment, to assess the sciatic nerve regeneration. The results showed that early NM treatment (NM1 day) accelerated the processes of the sciatic nerve regeneration and reduced the nociceptive response (mechanical allodynia). As regarding to the late treatments (NM5 and NM10 days), these groups only showed a reduction in the nociceptive response produced by the nerve lesion but not changes in motor function. At the distal portion of the sciatic nerve, the NM1d group showed an increased average myelin sheath thickness, furthermore, the NM5d group showed a greater density of myelinated fibers. These data provide evidence that early neural mobilization treatment induced two beneficial effects: an improvement in functional recovery and reduction of mechanical allodynia, however, the late treatment (MN5d and MN10d) only had effect in reducing the nociceptive response (mechanical allodynia).

Key Words: Neural mobilization - early mobilization – rats - sciatic nerve regeneration – functional recovery - neuropathic pain – physiotherapy - .

Trabalhos que foram desenvolvidos durante o curso de mestrado relacionados ao modelo de esmagamento do nervo ciático que foram submetidos ou que se encontram em preparação para publicação:

MARTINS D. F.; MAZZARDO L.; NASCIMENTO F. P.; LIMA D. A. N.; SPECKHANN B.; FAVRETTO G.; GADOTTI V. M.; FERREIRA E. C.; SANTOS A. R. S. Neural mobilization accelerates functional, sensory and motor recovery of sciatic nerve after traumatic injury. (submetido).

MARTINS D. F.; MAZZARDO L.; LIMA, BRESSAN E.; D. A. N; SANTOS, A. R. S. Neural mobilization inhibit mechanical allodynia and glial activation in the spinal cord induced by sciatic nerve crush. 2008, em preparação para publicação.

SIMÃO, R.; MARTINS, D. F.; MAZZARDO, L.; KOHLER, M. C.; JEREMIAS, T. S.; SILVA, M. A.; TRENTIN, A.; SANTOS, A. R. S. Effects of mesenchymal stem cells (MSC) obtained from human placenta on neuropathic pain and regeneration of sciatic nerve after crush injury in rats. 2008, em preparação para publicação.

MARTINS, D. F.; MAZZARDO, L.; SPECKHANN, B. A.; NASCIMENTO, F. P.; LIMA, D. A. N.; FERREIRA, E. C.; SANTOS, A. R. S. Can the passive joint mobilization of the ankle interfere in the regeneration processes after the sciatic nerve crush injury in rats? 2008, em preparação para publicação.

MARTINS D. F.; MAZZARDO L.; LIMA, BRESSAN E.; D. A. N; SANTOS, A. R. S. Articular mobilization inhibit mechanical allodynia and glial activation in the spinal cord induced by sciatic nerve crush. 2008, em preparação para publicação.

GADOTTI V. M.; MARTINS D. F.; MAZZARDO L.; NASCIMENTO F. P.; LIMA D. A. N.; SPECKHANN B.; FAVRETTO G.; FERREIRA E. C.; SANTOS A. R. S. Agmatine accelerates functional, sensory and motor recovery of sciatic nerve after traumatic injury. 2008, em preparação para publicação.

LIMA, D. A. N.; MARTINS, D. F.; MAZZARDO, L.; NASCIMENTO, F. P.; SANTOS, A. R. S. Acupoint Kunlun (B60) accelerates functional recovery and reduces mechanical and cold allodynia after sciatic nerve crush in mice. 2008, em preparação para publicação.

GADOTTI V. M.; MARTINS D. F.; MAZZARDO L.; LIMA, BRESSAN E.; D. A. N; SANTOS, A. R. S. Agmatine inhibit mechanical and thermal allodynia and glial activation in the spinal cord induced by sciatic nerve crush. 2008, em preparação para publicação.

Outros trabalhos que foram desenvolvidos durante o curso de mestrado e que foram submetidos para publicação.

ROSA A. O.; MARTINS D. F.; GADOTTI V.M.; MAZZARDO L.; EGEA J.; NASCIMENTO F.P.; CUADRADO A.; LÓPEZ M. G. ; SANTOS A. R. S. The antinociceptive effect of AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor in mice. Journal of the International Association for the Study of Pain. **Pain**, 2008 (submetido).

NASCIMENTO F. P., FIGUEREDO S. M., ALMEIDA R. C., MARTINS D. F.; OSTROSKI R.M.; RODRIGUES A. L. S. Santos A. R. S. Antinociception produced by systemic, spinal and supraspinal administration of inosine in mice: Evidence for the involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2008 (submetido).

GUGINSKI, G. ; FERREIRA, V. ; MARTINS, D. F.; MASSARO, M. ; SANTOS, A. R. S The antinociceptive role of *Melissa officinalis* ethanolic extract and its possible mechanisms of action. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2008 (submetido).

WERNER, J. A. T.; OLIVEIRA, S. M. ; MARTINS, D. F. ; MAZZARDO, L. ; DIAS, J. ; MIGUEL, O. ; LORDELLO, A. ; ROYES, L. F. ; FERREIRA, J. ; SANTOS, A. R. S.. Evidence for a role of 5-HT1A receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. International Society for Ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, 2008 (submetido).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia funcional e organização estrutural do nervo

Os seres humanos são capazes de realizar movimentos amplamente especializados com o sistema nervoso alongado ou relaxado, estático ou em movimento. Pesquisas envolvendo a elasticidade em dançarinos, ou esportistas e mulheres, por exemplo, tornam isto óbvio. O sistema nervoso não somente tem que conduzir impulsos através de notáveis amplitudes e variedades de movimentos, mas também tem que se adaptar mecanicamente durante os movimentos (BUTLER, 2000).

A organização estrutural do sistema nervoso permite que os axônios conduzam impulsos, facilitando a interação do indivíduo com o mundo e possibilita a sustentação de variadas posturas do tronco, cabeça e membros (THOMAS, 1963).

Normalmente os axônios são referidos como “fibras nervosas”. O citoplasma do axônio, conhecido como axoplasma, é contido, e flui dentro e ao redor de um complexo citoesqueleto formado principalmente de microtúbulos e neurofilamentos. Cada axônio é circundado por células de Schwann, as quais, no caso das fibras mielinizadas, produzem mielina que encobrem o axônio. Dentro desta organização, um neurônio periférico compreende um corpo celular, alguns dendritos e um axônio.

Os axônios mielinizados ou não-mielinizados são agrupados juntos em feixes ou fascículos. Em fibras não-mielinizadas, uma célula de Schwann está associada com vários axônios, ao passo que, nas fibras mielinizadas, a proporção é de uma célula de Schwann por internodo axonal. A mielinização efetuada pelas células de Schwann é descontínua, sendo que as partes de axolema expostas são conhecidas como nódulo Ranvier. A descontinuidade da bainha de mielina permite a rápida condução de impulsos nervosos visto que o potencial de ação salta de um nódulo para o outro (BUTLER, 2000).

Os axônios dentro do nervo são extensos prolongamentos do corpo celular de neurônios sensoriais (gânglio da raiz dorsal), de neurônios autonômicos (gânglio autonômico) e de neurônios motores (corno ventral da medula espinhal ou tronco encefálico). Por seus terminais serem muito distantes do corpo celular, os axônios são isolados um do outro, envolvidos e protegidos por três camadas de tecido conjuntivo: o endoneuro, o perineuro e o epineuro (THOMAS, 1963).

O endoneuro é uma estrutura distensível, elástica, feita de uma matriz de fibrilas de colágeno, formando um tubo endoneural que circunda a membrana basal. Dentro do endoneuro, todos os axônios estão intimamente associados às células de Schwann (Figura 1). A mielina de cada axônio mielinizado é formada pela membrana plasmática de uma célula de Schwann envolvida firmemente várias vezes em volta do axônio (TOPP; BOYD, 2006). As células de Schwann de cada axônio mielinizado ou grupo de axônios não-mielinizados estão envolvidas por uma lâmina basal de colágeno tipo IV, fibronectina, laminina e sulfato de heparana. Entre os axônios há um tecido conjuntivo frouxo de fibrilas de colágeno do tipo I e tipo II em orientação longitudinal, fibroblastos, mastócitos, macrófagos e fluido endoneural (TOPP; BOYD, 2006).

O perineuro é uma bainha de tecido conjuntivo que envolve axônios, células de Schwann e componentes do tecido endoneural formando um fascículo nervoso (Figura 1). Por conseguinte, o perineuro é formado por mais de 15 camadas de células perineurais intercaladas com fibras de colágeno do tipo I, fibrilas de colágeno tipo II e fibras elásticas dispostas em orientação circunferencial, oblíqua e longitudinal (ver figura 1) (GAMBLE; EAMES, 1964). Cada camada de células perineurais possui uma lâmina basal muito organizada com a camada íntima contendo laminina, sulfato de heparana e fibronectina (SCHIFF; ROSENBLUTH, 1986).

As células perineurais se sobrepõe formando assim “junções oclusivas”, sendo que as mais internas formam uma barreira de difusão com as mesmas funções da barreira hematoencefálica no controle do ambiente endoneural (SHANTHAVEERAPPA; BOURNE, 1962; RECHTHAND; RAPOPORT, 1987). À vista disso, com lamelas compostas de colágeno e uma pequena quantidade de elastina, o perineuro é visto como a estrutura mais resistente às forças tensionais (SUNDERLAND, 1990). Muitas das fibras colágenas correm paralelas às fibras nervosas, embora existam feixes circulares e oblíquos os quais podem proteger o nervo de enroscar quando tem de contornar um ângulo agudo, como faz o nervo ulnar no cotovelo (THOMAS, 1963; SUNDERLAND; BRADLEY, 1949; RYDEVIK et al., 1990).

O epineuro é o revestimento de tecido conjuntivo mais externo que circunda, protege os fascículos. Vários fascículos nervosos são contidos pela bainha epineural formando um nervo, como ilustra a figura 1. As camadas epineurais contêm fibras de colágeno tipo I e tipo III, fibras elásticas, fibroblastos, mastócitos e células adiposas. Desta maneira, em posição frouxa, as fibras de colágeno epineural possuem uma orientação ondulada (STOLINSKI, 1995). O número de fascículos e a proporção do tecido epineural são variáveis entre os nervos e ao longo do comprimento do mesmo nervo (SUNDERLAND, 1990). Desta forma, o

epineuro interfascicular está frouxamente unido ao perineuro, permitindo o deslizamento de um fascículo independentemente do fascículo adjacente, como é visto na figura 1 (MILLESSE et al., 1995). Além disso, há abundante tecido conjuntivo epineural nos nervos que contêm muitos fascículos facilitando assim, a dispersão de forças compressivas (SUNDERLAND, 1965).

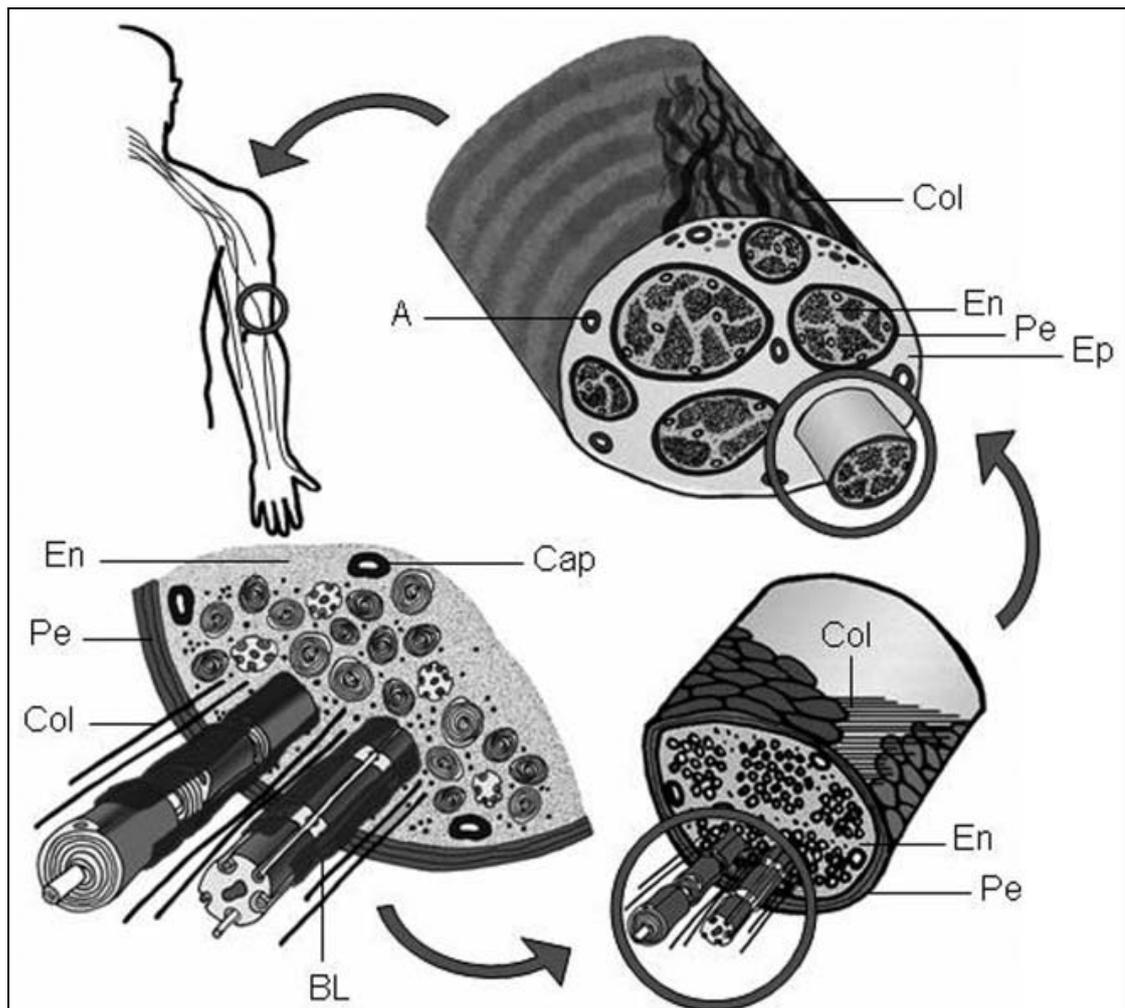


Figura 1. Componentes estruturais dos nervos periféricos. Compartimento endoneural (En); lâmina basal (BL); Capilares (Cap); Colágeno (Col); Perineuro (Pe); Epineuro (Ep); Arteríolas (A). **Fonte:** Topp; Boyd, 2006.

1.2 Movimentos das articulações e estresse físico

Em condições fisiológicas normais impostas pelo movimento e postura, os nervos são expostos a vários estresses mecânicos. O movimento das articulações é o primeiro modo pelo qual forças indutoras de movimento são aplicadas ao sistema nervoso, provocando o estresse físico. Neste contexto, estresse físico é definido como pressão ou tensão agindo sobre certa área de tecido (DRISCOLL et al., 2002) e pode ser aplicado ao nervo como tensão, compressão ou cisalhamento, ou ainda como uma combinação dos três.

A tensão pode ser aplicada em paralelo ou perpendicular ao comprimento do nervo, causando respectivo estresse longitudinal ou transversal sobre ele. Quando o movimento articular causa alongamento do nervo, o mesmo é colocado sob estresse tênsil por alongamento e deslizamento (MILLESSE et al., 1995), como é ilustrado na figura 2.

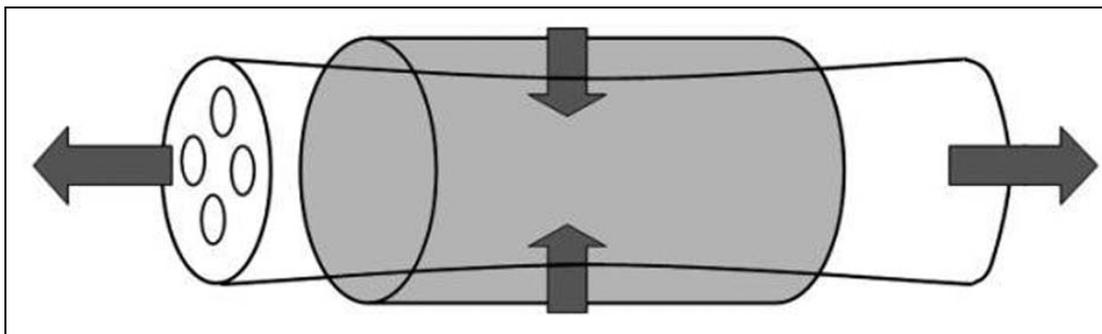


Figura 2. Estresse físico aplicado sobre o nervo. O estresse tênsil aplicado longitudinalmente ao nervo periférico produz um alongamento do nervo (aumento da tensão). A contração transversal que ocorre durante este alongamento é aumentada no centro da secção do nervo. **Fonte:** Topp; Boyd, 2006.

Durante o movimento articular, ocorre um aumento do comprimento neural no lado convexo das articulações e uma diminuição no lado côncavo. Os eventos neurais que seguem o movimento articular são, portanto, influenciados pela localização do nervo em relação ao eixo da articulação. Se o nervo estiver situado no lado convexo, ficará sujeito às forças de alongamento, enquanto que se localizado no lado côncavo, sofrerá influência de forças de encurtamento (SHACKLOCK, 2005).

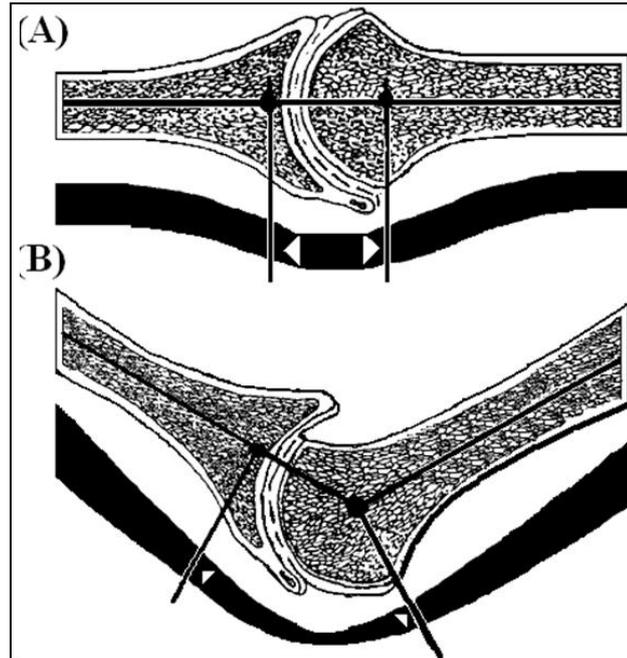


Figura 3. Diagrama de um nervo paralelo em uma articulação em diferentes posições. As flechas indicam o comprimento do nervo ao nível da articulação. Posição (a) Neutra- o nervo está frouxo. Posição (b) Angulada- o nervo está alongado, acompanhando o movimento articular. **Fonte:** Shacklock, 1995.

1.3 Respostas fisiológicas ao estresse físico dos nervos

As propriedades estruturais e biomecânicas dos nervos podem ser modificadas com a aplicação de estresse físico, através de movimentos extrínsecos e posturas. De acordo com a teoria do estresse físico de Mueller e Maluf (2002), o nível de estresse colocado sobre um tecido biológico produz uma resposta adaptativa do tecido. Neste sentido, níveis de estresse menor do que o requerido para a manutenção do tecido (estresse baixo) resultam na redução da habilidade do tecido em tolerar estresse subsequente e é consistente com a plasticidade e resposta à demanda funcional (Figura 4). No entanto, níveis de estresse na amplitude requerida para a manutenção do tecido (estresse normal) mantêm um estado de equilíbrio.

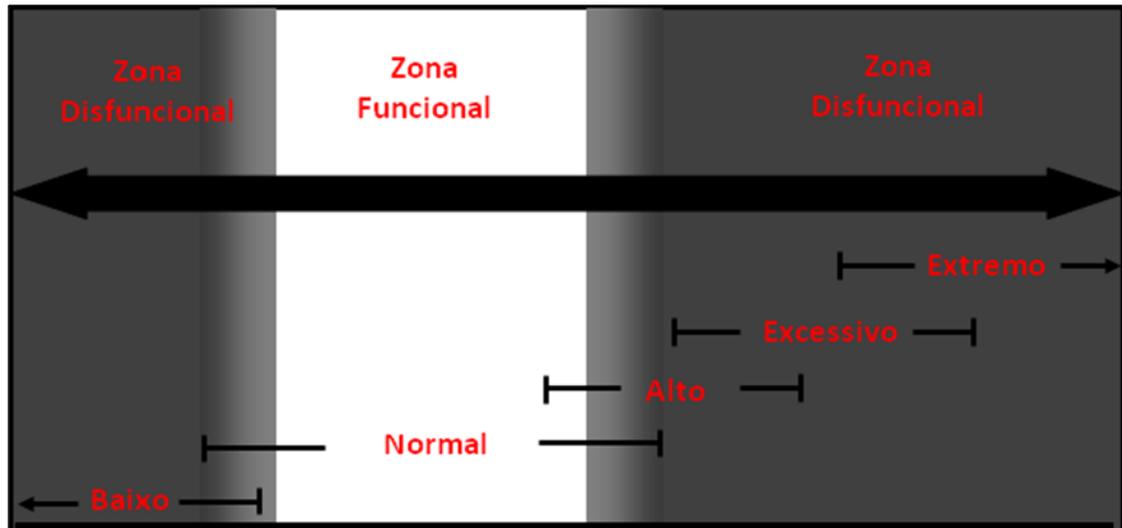


Figura 4. Estados de estresse físico contínuo. A área branca representa a zona funcional na qual o estresse físico sobre o nervo é suficiente para manter um estado de equilíbrio e função fisiológica normal. A área cinza representa as zonas disfuncionais resultantes de vários níveis de estresse físico colocado sobre o tecido nervoso. **Fonte:** Topp; Boyd, 2006.

Todavia, níveis de estresse físico que excedem a amplitude requerida para a manutenção (estresse alto) resultam em um aumento da tolerância do tecido, num esforço para encontrar a demanda mecânica. Níveis de estresse físico que excedem a capacidade de alguns componentes do tecido (estresse excessivo) resultam em lesão tecidual. Além disso, níveis de estresse físico que são extremos resultam em morte tecidual. Contudo, é importante ressaltar que o estresse físico pode variar em relação à magnitude, ao tempo, à direção ou ao tipo de estresse (Figura 4).

Assim, no desuso, no super-uso ou na lesão, a zona funcional do nervo é alterada. Na zona funcional, o estresse físico sobre o nervo é suficiente para manter o estado de equilíbrio e a função fisiológica do nervo. Já na zona disfuncional, vários níveis de estresse físico alteram a habilidade do nervo em tolerar estresse subsequente (Figura 4).

1.4 Lesões dos nervos e degeneração Walleriana

Estima-se que a prevalência das neuropatias periféricas seja de aproximadamente 2.400 a cada 100.000 habitantes (2,4 % da população mundial). (ENGLAND; ASBURY, 2004). Além disso, algumas neuropatias periféricas de origem traumática também afetam outros tecidos, como esmagamento, compressão, estiramento, avulsão e secção parcial ou total. Estas lesões resultam na parada da transmissão de impulsos nervosos e, por conseguinte, na perda ou diminuição da sensibilidade e motricidade no território inervado (OGARD; STOCKER, 1994; AZZE; MATTAR JR., 2000).

Neste sentido, o primeiro sistema de classificação das lesões nervosas periféricas foi descrito por Cohen em 1941 (SUNDERLAND, 1951), como: neuropraxia, axonotmese e neurotmese (Figura 5). Mais tarde, Seddon, após examinar 650 pacientes, popularizou o sistema de Cohen (SEDDON, 1942; 1943). Onze anos depois, Sunderland definiu 5 graus distintos de lesões nervosas, sendo este sistema de classificação o mais usado atualmente (SUNDERLAND, 1951). No sistema proposto por Sunderland, baseada na classificação original usada por Seddon, os 3º e 4º graus de lesões foram incluídos como extensões de axonotmese e neurotmese, respectivamente (Figura 5).

Comparação das classificações das lesões do sistema nervoso periférico.				
Seddon (1975)	Sunderland	Perda Funcional	Lesão Anatômica	Neurofisiologia
Neuropraxia (não degenerativa)	Grau I	Força muscular, gnose.	Bainha do axônio e fibra nervosa intacta	Mantém condução distal, sem fibrilação
Axonotmese (degenerativa)	Grau II, III	Todas modalidades	Interrupção do axônio e degeneração Walleriana distal	Perda da condução; fibrilação
Neurotmese (degenerativa)	Grau IV, V	Todas modalidades	Interrupção do tronco nervoso; degeneração Walleriana	Perda da condução; fibrilação

Figura 5. Comparação classificações das lesões do sistema nervoso periférico. **Fonte:** Stokes, 2004.

Em relação à axonotmese, (lesão de compressão), o axônio proximal brota e as faixas distais de células de Schwann mantêm-se em sua orientação original, logo as fibras nervosas são arranjadas como estavam antes da lesão. Desta forma, quando os axônios se regeneram, eles encontram as suas posições originais dentro do nervo e têm mais probabilidade de se reconectarem de forma precisa com os seus alvos. Assim, a chance de regeneração axonal é maior quando um nervo periférico é comprimido ou esmagado, mas não quando é rompido (Figura 6).

Além disso, quando a compressão ou esmagamento provoca a morte dos axônios distais ao local da lesão (processo conhecido como degeneração Walleriana, que se inicia horas após a lesão e se completa de 6 a 8 semanas) (HAINES, 2006) os corpos neuronais, que

estão na medula espinhal ou nos gânglios sensoriais ou autônomos, normalmente sobrevivem. No entanto, estes corpos celulares podem sofrer mudanças chamadas reações cromatolíticas (o corpo celular incha, o núcleo move-se para uma posição excêntrica e o retículo endoplasmático rugoso torna-se fragmentado) em resposta ao trauma (Figura 6B). De dias a semanas mais tarde, o brotamento axonal começa no ponto da lesão e os novos axônios crescem em direção distal. Neste meio tempo, na parte distal do nervo, os axônios se degeneram, sendo removidos pelos macrófagos. Entretanto, as células de Schwann da porção distal do nervo lesado permanecem, auxiliando os macrófagos (principal via fagocítica) na fagocitose de fragmentos ou restos de mielina em certa extensão do axônio (Figura 6B) (TANAKA et al., 1992).

Dentro de 2 a 3 dias após a lesão, há um importante infiltrado de macrófagos dentro do nervo em degeneração que é atraído por citocinas, tais como: proteína quimioatrativa de monócitos-1 (PQM-1), fator inibidor da leucemia (FIL) e interleucina (IL-1) secretadas por células de Schwann reativas (TOFARIS et al., 2002). Além disso, as células de Schwann diferenciadas dentro do tubo endoneural proliferam (principalmente no terceiro dia após a lesão) (SALONEN et al., 1988), formando cordões chamados de faixas de Büngner (Figura 6C), onde as células de Schwann e os tubos da lâmina basal guiam os brotos axonais no crescimento distal. A parte distal do nervo em regeneração, o tubo endoneural, as células de Schwann e a lâmina basal, constituem a unidade regenerativa (HOFFMAN; LASEK, 1980).

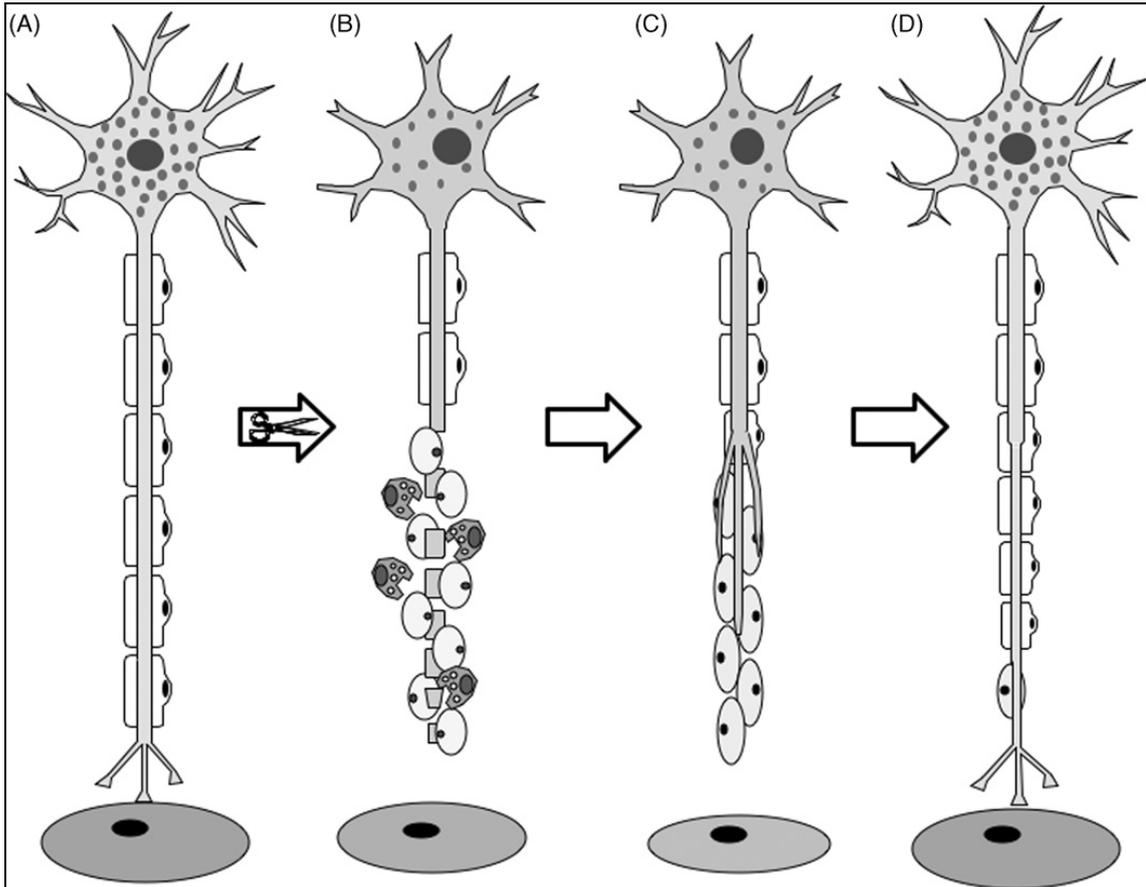


Figura 6. Desenho esquemático dos principais eventos da degeneração e regeneração após lesão nervosa periférica. (A) fibra nervosa normal; (B) transecção das fibras; (C) finos brotos emergindo do final do ramo axonal proximal; (D) Reconexão com as células alvo e a maturação das fibras nervosas. **Fonte:** Navarro, et al., 2006.

Os macrófagos, que foram ativados pelos restos de mielina, sinalizam para as células de Schwann secretarem fatores de crescimento neural tais como NGF, uma neurotrofina que promove o crescimento do axônio. A regeneração depende de diversos fatores, incluindo as neurotrofinas fornecidas pelas células de Schwann reativas e pela matriz extracelular. A taxa de crescimento dos axônios em brotamento é inicialmente muito baixa e alcança dentro de 3-4 dias algo em torno de 2-3 mm/dia (VERDÚ; NAVARRO, 1997).

1.5 Avaliação da função motora

Em condições experimentais, a recuperação das lesões nervosas periféricas é estudada principalmente através de técnicas de eletrofisiologia e histologia (morfometria). Não obstante, é importante conhecer o grau de recuperação funcional que estas lesões representam. Neste sentido, de Medinaceli e colaboradores (1982) desenvolveram um método quantitativo confiável e reproduzível da condição funcional do nervo ciático de ratos, denominado de

Índice Funcional do Ciático (IFC). O método é baseado na medida de parâmetros pré-estabelecidos nas impressões da pata posterior dos animais obtidos enquanto eles caminham.

Um dos métodos mais modernos de avaliação funcional é aquele proposto por Bervar (2000), o qual utiliza técnicas de captura e análise digital da deambulação de animais de laboratório. Este método é facilmente reproduzível, acurado e sensível, produzindo resultados mais precisos, em contraste àqueles descritos por de Medinaceli.

Levando-se em consideração que os ramos tibial e fibular do nervo ciático contribuem anatomicamente para o movimento e manutenção da distância entre o 1º e o 5º dedos (WALKER et al., 1994a, b ; MEEK et al., 2001), a avaliação do espalhar dos dedos foi sugerida como uma forma de avaliar a recuperação motora. Trabalhos usando esse parâmetro introduziram um novo índice funcional, o Índice Estático do Ciático (IEC). Neste método de avaliação, as distâncias entre os respectivos dedos são registradas durante o período de repouso (BERVAR, 2000; BERVAR, 2002).

Embora dados funcionais e morfológicos sejam utilizados para avaliar a regeneração nervosa após lesões induzidas por esmagamento, a correlação entre esses dois tipos de avaliações é normalmente pobre (DELLON; MACKINNON, 1989; KANAYA et al., 1996).

Os métodos de avaliações dos nervos recentemente desenvolvidos, incluindo a histomorfometria e marcação fluorescente retrógrada (MACKINNON et al., 1988), não necessariamente prevêm o restabelecimento das funções motoras e sensoriais (DE MEDINACELI et al., 1982; VAREJÃO et al., 2004b). Apesar de, essas técnicas serem úteis para estudar o processo de regeneração do nervo, elas geralmente falham na avaliação da recuperação funcional (SHEN; ZHU, 1995). Neste sentido, as pesquisas envolvendo lesões dos nervos necessitam conciliar técnicas de avaliações sensório-motoras e histomorfométricas.

1.6 Dor neuropática periférica

Lesões do sistema nervoso periférico podem resultar em substancial perda funcional e diminuição da qualidade de vida pelo permanente prejuízo das funções sensório-motoras e problemas secundários (dor neuropática, p.ex.), tendo como consequências sociais longos períodos de afastamento do trabalho (JAQUET et al., 2001; ROSBERG et al., 2005).

A dor neuropática implica em patologia do sistema somatossensorial do sistema nervoso periférico (dor neuropática periférica) ou do sistema nervoso central (dor neuropática central). Esta nova definição de dor neuropática foi proposta por Troels S. Jensen e publicada

pelo comitê de diretoria do grupo de interesse especial sobre dor neuropática (NeuPSIG), incluída em 2008 na terminologia de dor da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (LOESER; TREEDE, 2008).

Foram reconhecidos dois tipos de dor neuropática que acompanham a lesão nervosa: “dor disestésica” e “dor do tronco nervoso” (ASBURY; FIELDS 1984). A dor disestésica resulta da descarga de impulsos originados em fibras aferentes nociceptivas lesadas ou em processo de regeneração. Além disso, foi demonstrado que estas descargas desempenham um papel chave na dor neuropática periférica (BUTLER, 2000), sendo esta dor resultante de estímulos gerados ectopicamente relacionados à alteração do número e função de canais iônicos no local de desmielinização do nervo danificado por trauma ou doenças.

Em contrapartida, a dor de tronco nervoso é atribuída a uma atividade aumentada dos nociceptores, sensibilizados química ou mecanicamente, no interior dos revestimentos de tecido conjuntivo (ASBURY; FIELDS 1984). Sabe-se, por exemplo, que os troncos nervosos periféricos são mecanossensíveis por possuírem no interior de seu tecido conjuntivo aferências mecanorreceptoras (HROMADA, 1963; THOMAS et al., 1993). Estas aferências são conhecidas como *nervi nervorum* e são, em sua maioria, desmielinizadas, formando um plexo descontínuo em todo o tecido conjuntivo do nervo e possuindo, predominantemente, terminações nervosas livres (HROMADA, 1963).

Em seus estudos eletrofisiológicos, Bove e Light (1997) demonstraram que pelo menos parte do *nervi nervorum* possui função nociceptiva, pois responde a estímulos nocivos mecânicos, químicos e térmicos. Assim, muitos dos *nervi nervorum* estudados por Bove e Light são sensíveis ao excesso de alongamento longitudinal de todo o nervo por eles innervado, alongamento local em qualquer direção e também à pressão focal. Apesar de, os *nervi nervorum*, não respondem ao alongamento nas amplitudes normais de movimento (KUSLICH et al, 1991; HALL e QUINTNER, 1996).

Após a indução de uma lesão nervosa parcial ou total, ocorre uma sequência de eventos importantes como: (1) produção imediata de disparos de potenciais de ação (SELTZER et al., 1991) seguidas por descargas anormais que podem continuar por um longo período de tempo (WALL; GUTNICK, 1974; WALL; DEVOR, 1983) sobre as fibras nervosas intactas e danificadas (ALI et al., 1999; WU et al., 2002; MA et al., 2003; OBATA et al., 2003); (2) secreção de neuropeptídeos e mediadores pró-inflamatórios no local da lesão e no sistema nervoso central (TRACEY; WALKER, 1995; MA; BISBY, 1998); (3) ativação de nociceptores e sensibilização de nociceptores silenciosos através da liberação de produtos inflamatórios (DRAY; BEVAN, 1993; SCHMIDT et al., 1995) ou da expressão de novos

receptores (BIRDER; PERL, 1999; revisado por NOGUCHI, 2006) ou canais iônicos (ver revisão em WAXMAN et al., 1999; DEVOR, 2006b); (4) mudanças sobre a expressão gênica e a expressão de vários peptídeos e receptores (revisado por DEVOR, 2006a; HOKFELT et al., 2006); (5) brotamento anormal de fibras periféricas e centrais (WOOLF et al., 1995; RUOCCO et al., 2000); e finalmente, (6) mudanças no campo receptivo e modalidades sensoriais das fibras periféricas danificadas e intactas (LIU et al., 2000; PITCHER; HENRY, 2004).

1.7 Mobilização neural

Os conceitos e as técnicas de mobilização neural são de origem bastante antiga. A primeira descrição conhecida de um teste neurodinâmico foi em papiro escrita por Imhotep em 2800 a.C., no qual uma manobra de estiramento da perna foi realizada no diagnóstico de dor na coluna lombar em trabalhadores que participaram da construção das pirâmides do Egito (BEASLEY, 1982; DYCK, 1984).

Técnicas de mobilização neural são métodos fisioterapêuticos (cinesioterápicos), que promovem movimentos passivos ou ativos, focando na restauração da capacidade do sistema nervoso em tolerar forças normais de tensão, compressão e fricção associadas com atividades diárias e esportivas. Esta técnica fisioterápica de terapia manual envolve alongamento ou encurtamento dos troncos nervosos, raízes, nervos, coluna e meninges espinhais através de movimentos e posicionamentos articulares (BUTLER, 1991).

Nas últimas décadas, tem sido observado o desenvolvimento de pesquisas sobre os conceitos básicos de métodos fisioterapêuticos, incluindo a mobilização neural (BUTLER, 1991). Além disso, esta técnica e seus mecanismos fundamentais são objeto de numerosos estudos clínicos. Foi encontrado em pesquisa clínica na qual os pacientes foram submetidos ao tratamento com mobilização neural, melhora na capacidade motora, dor e centralização dos sintomas (CLELAND et al., 2006). Entretanto, resultados inconclusivos também foram observados após o tratamento realizado em pacientes que sofreram descompressão lombar cirúrgica (KITTINGHAM, 1996).

Pesquisadores têm mostrado o processo biológico que ocorre no tecido neural e envoltórios conjuntivos submetidos ao tratamento com mobilização neural. Neste sentido, numerosos trabalhos sugerem que esta técnica fisioterápica pode exercer impacto positivo sobre os sintomas da lesão dos nervos por aumentar a circulação intraneural, fluxo axoplasmático, viscoelasticidade do tecido conjuntivo neural e por reduzir a sensibilidade dos

locais que geram impulsos nervosos anormais (BUTLER, 2000; SHACKLOCK, 2005). No entanto, estas hipóteses biologicamente plausíveis não têm sido comprovadas.

1.7.1 Teste de elevação da perna estendida (TEPE)

Lesões mecânicas de qualquer natureza no sistema nervoso periférico levam ao aumento da mecanossensibilidade do nervo e mudanças na dinâmica neural. Acredita-se que estas lesões possam contribuir para o desenvolvimento de algumas síndromes dolorosas (SHACKLOCK, 1996). Assim, testes neurodinâmicos têm sido usados para avaliar e tratar tais lesões (ELVEY, 1986; BUTLER, 1991, 2000; SHACKLOCK, 1996).

O teste de elevação da perna estendida (TEPE) (do inglês, *Straight Leg Raise*) é um teste de tensão ou irritação, sendo este um procedimento bem conhecido e rotineiramente usado na avaliação de patologias da coluna lombar. Em 1951, Charnley afirmou em relação à dor lombar que “... o TEPE é mais importante do que todos os outros sinais radiológicos e clínicos juntos” (CHARNLEY, 1951). Ademais, tem sido demonstrada sua validade e especificidade no diagnóstico de hérnia discal. O TEPE foi descrito pela primeira vez por Forst, um aluno de Laségue, em sua tese de doutorado em 1881, mas é a Laségue que o teste é agora amplamente atribuído (DYCK, 1984). Desde então, houve várias modificações do teste.

Lazeveric em 1884 demonstrou que a dorsiflexão do tornozelo poderia aumentar a tensão no nervo ciático durante o TEPE (DYICK, 1984). Flexão cervical (REID, 1960) e flexão do quadril (BREIG; TROUP, 1979) também foram adicionadas a este teste. O TEPE permanece, com ou sem modificações, há 100 anos como ferramenta clínica na avaliação de patologias da coluna lombar.

Em 2005, Boyd e colaboradores mostraram pela primeira vez a excursão e tensão no nervo ciático em ratos, *in vivo* e eutanasiados, durante o TEPE modificado. Estes autores incluíram a manobra de sensibilização como a dorsiflexão do tornozelo, antes e após a lesão traumática. Neste estudo, os autores determinaram diferentes posicionamentos do membro posterior do animal, semelhante ao posicionamento do TEPE. Os autores observaram que a lesão traumática do nervo causou significantes mudanças nas propriedades mecânicas do mesmo, evidenciadas pelo aumento de tensão durante a flexão de quadril e dorsiflexão de tornozelo, na primeira semana após a lesão.

Além disso, os pesquisadores notaram que a tensão produzida pela flexão de quadril e dorsiflexão do tornozelo em ratos vivos chegou a 15%, semelhante a valores encontrados em

estudos com testes neurodinâmicos para o membro superior realizados em cadáveres humanos (WRIGHT et al., 1996; WRIGHT et al., 2001).

1.7.2 Técnicas de mobilização neural (tensionamentos neurodinâmicos)

Os tensionamentos neurodinâmicos são técnicas fisioterápicas específicas de mobilização neural que são usadas para ativar funções fisiológicas e viscoelásticas, relacionadas ao movimento do sistema nervoso. A tensão é aplicada aos tecidos neurais (nervo ciático, p. ex.) por aumento da distância entre cada extremidade do trato nervoso. Uma característica chave do tensionamento é que, além das articulações serem movimentadas, o tecido inervado é usado para aplicar tensão ao nervo. A flexão dorsal do tornozelo e extensão dos artelhos durante a realização do Teste de Extensão da Perna Estendida (TEPE), combinada com o restante do teste, é um exemplo de tensionamento (SHACKLOCK, 2005). Os tensionamentos são realizados com movimentos de grande amplitude, nos quais a estrutura neural volta a sua posição, sem carga. Isto porque o intuito é estimular a melhora da capacidade da estrutura neural para responder às alterações de tensão. A resposta é alcançada em dois níveis: redução da sensibilidade do tecido nervoso à tensão, e melhora do comportamento viscoelástico.

Tratamentos com mobilização neural são sugeridos como uma alternativa para recuperar as funções fisiológicas e mecânicas do sistema nervoso (BUTLER, 1991, 2000; SHACKLOCK, 1995). Além disso, na clínica, a mobilização neural é usada para restaurar a plasticidade do sistema nervoso, definida como a capacidade das fibras nervosas e suas bainhas de tecido conjuntivo de deslizarem em relação a outras estruturas (SHACKLOCK, 1995; BUTLER, 2000). No caso de pacientes que necessitem de tratamento pós-operatório, a mobilização neural deve ser iniciada o mais precoce possível após a cirurgia (POWELL; MYERS, 1986; DWORNIK et al., 2007).

Embora existam vários trabalhos demonstrando os efeitos do tratamento com mobilização neural, há muita controvérsia sobre a sua efetividade e os mesmos não contemplam a análise da influência de diferentes tempos de início de tratamento após lesão nervosa periférica. Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo verificar a influencia da mobilização neural sobre o esmagamento do nervo ciático de ratos, iniciada em diferentes tempos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a influência da mobilização neural do nervo ciático de ratos, iniciada em diferentes tempos após a lesão traumática (1, 5 e 10 dias), sobre a avaliação da recuperação funcional sensório-motora e histomorfométrica.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de recuperação funcional motora do nervo ciático de ratos tratado com mobilização neural a partir do 1º, 5º e 10º dia após o esmagamento, através do Índice funcional do ciático (IFC) e do Índice estático do ciático (IEC);
- Avaliar a capacidade de recuperação funcional sensorial do nervo ciático de ratos tratado com mobilização neural a partir do 1º, 5º e 10º dia após a lesão com mobilização neural, através do Teste do filamento de von Frey (alodinia mecânica) e do Teste da acetona (alodinia ao frio);
- Avaliar a influência do tratamento com mobilização neural sobre o processo de regeneração do nervo ciático, a partir do 1º, 5º e 10º dia após a lesão, através das quantificações dos seguintes parâmetros histomorfométricos: densidade de fibras mielinizadas (fibras/mm²); espessura média da bainha de mielina (µm), porcentagem de área de fibras mielinizadas (%), porcentagem de área de tecido conjuntivo (%) e porcentagem de área de fragmentos de degeneração (%)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 40 ratos Wistar machos (250 a 300 g) obtidos do Biotério Central da UFSC, mantidos em temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo de 12h claro e 12h escuro (luzes acesas às 6:00 h) e com água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor em animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar o efeito dos tratamentos. Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (protocolo 00192).

Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos compostos por 8 animais:

- Grupo 1 - Animais operados sem o esmagamento do nervo ciático e que não receberam tratamento (falso-operado) usado como controle (da cirurgia);
- Grupo 2 - Animais operados submetidos ao esmagamento do nervo ciático, este grupo também não recebeu tratamento (operados), foram usados como controle (do tratamento);
- Grupo 3 - Animais operados e submetidos ao esmagamento do nervo ciático e tratados com mobilização neural, que teve início no 1º dia após o esmagamento (MN1d);
- Grupo 4 - animais operados e submetidos ao esmagamento do nervo ciático e tratados com mobilização neural, que teve início no 5º dia após o esmagamento (MN5d); e
- Grupo 5 - animais operados e submetidos ao esmagamento do nervo ciático e tratados com mobilização neural, que teve início no 10º dia após o esmagamento (MN10d).

3.2 Procedimento cirúrgico

Inicialmente, os animais foram induzidos a caminhar sobre a pista de marcha 1 (uma) vez ao dia, por um período de 10 dias, para se familiarizarem aos procedimentos da coleta de dados antes do procedimento cirúrgico.

Para a realização da cirurgia, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal contendo cetamina (100 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg). Após a verificação do estado de consciência do animal (através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), efetuou-se a tricotomia da área a ser operada (coxa direita). Em seguida, fez-se uma incisão curvilínea no hemicorpo direito do animal, iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur e terminando próximo à fossa poplíteia, ao nível da inserção dos músculos ísquio-tibiais. A exposição do nervo ciático foi conseguida após a divulsão dos músculos semitendinoso e reto femoral (Figura 7).

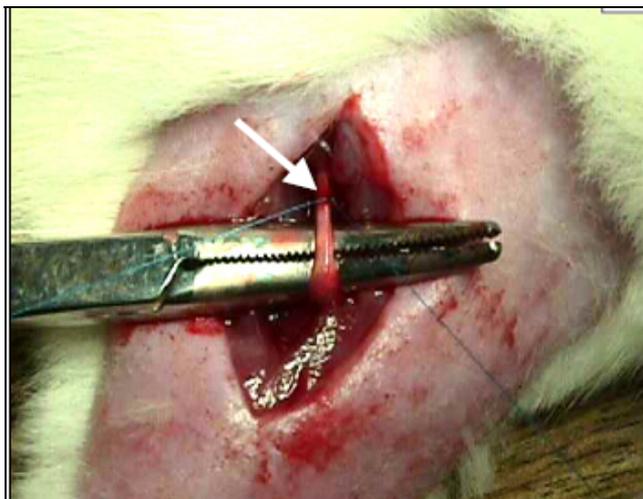


Figura 7. Marcação do local do esmagamento com fio de sutura (seta). **Fonte:** Raso, 2002.

Com o auxílio de uma pinça hemostática não-serrilhada (Figura 8) (adaptada de VAREJÃO et al., 2004a), realizou-se o esmagamento do nervo ciático direito por 30 segundos, apertando até o primeiro estágio da gramalheira da pinça, aproximadamente 10 mm acima da trifurcação do nervo (BRIDGE et al., 1994).



Figura 8. Pinça utilizada para realizar o esmagamento. À esquerda, o modelo da pinça utilizada; à direita, a seta mostra o local marcado para realizar o esmagamento padrão em todos os nervos, onde é mostrado o aspecto não-serrilhado da pinça.

Em seguida, um fio de sutura estéril não-absorvível (8-0) foi amarrado na bainha epineural para marcar o local do esmagamento (análise histológica) (REINECKE et al., 2003) (Figura7). Logo após, a divulsão muscular foi reparada com 2 pontos de sutura com fio absorvível (catego, 5-0) e realizada a assepsia no local com anti-séptico (Povidine®). Após a cirurgia, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada acesa como fonte de calor até retornarem a deambular pela caixa, voltando então ao biotério do laboratório.

3.3 Tratamento com mobilização neural

O tratamento com mobilização neural passiva foi realizado com os animais ligeiramente anestesiados com 1-2% de isoflurano, procedimento realizado individualmente. O grupo operado e submetido ao esmagamento que não recebeu tratamento (controle) foi anestesiado sempre que os grupos tratados recebiam o tratamento para descartar o possível efeito anti-alodínico do anestésico sobre os resultados (SLUKA; WRIGHT, 2001).

Um aparato de madeira adaptado do descrito previamente por Boyd e colegas (2005), foi usado para estabilizar o animal (no qual consistia de velcros na região torácica e coccígea) e na manutenção do membro posterior direito na posição pré-estabelecida, a qual foi: 110° flexão de quadril, 75° flexão de joelho e 10° dorsi-flexão do tornozelo (posição semelhante ao teste EPE e que coloca $22.56 \pm 15.47\%$ de tensão sobre o nervo ciático lesionado (BOYD et al., 2005). Esta posição foi mantida com a ajuda de pregos de metal envolvidos com espuma. O membro esquerdo foi mantido em flexão com o auxílio de fitas.

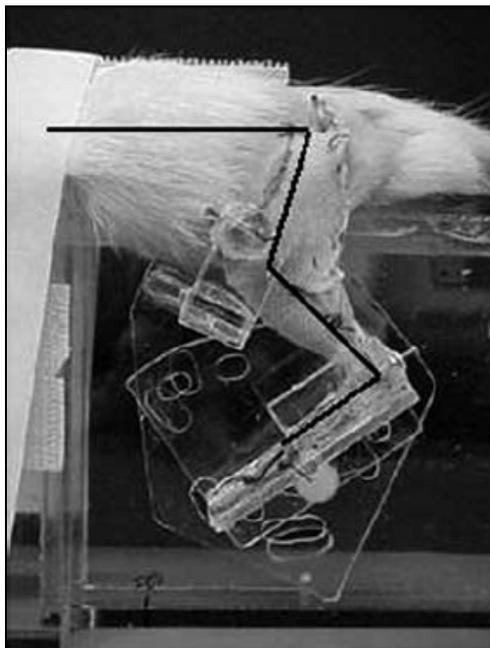


Figura 9. Modelo do aparato utilizado para realizar o posicionamento do membro posterior do animal e subsequente tratamento com mobilização neural. **Fonte:** Boyd et al, 2005.

Na realização do tratamento, os animais foram posicionados individualmente com o auxílio do aparato de madeira. O tratamento foi realizado no membro posterior direito, através de suaves oscilações na articulação do tornozelo, onde a mesma foi mobilizada em plantiflexão até o limite da amplitude de movimento e dorsiflexão, não excedendo a 10°. O tempo total do tratamento constou de 9 minutos de mobilização passiva do tornozelo, sendo 3 séries de 3 mobilizações por 3 minutos, com intervalos de 30 segundos entre cada mobilização, como descrito por Sluka e Wright (2001). Os tratamentos foram realizados uma vez por dia, com 48 horas de repouso entre um tratamento e outro, totalizando 15 sessões de tratamento cada grupo (Figura 10).

3.4 Avaliação da recuperação funcional sensório-motora

Todos os animais foram avaliados durante 8 semanas. Foi realizada uma avaliação pré-operatoriamente (Pre) e após a cirurgia a cada 3-4 dias até a 3ª semana. Nas 5 semanas restantes, as avaliações foram semanais.

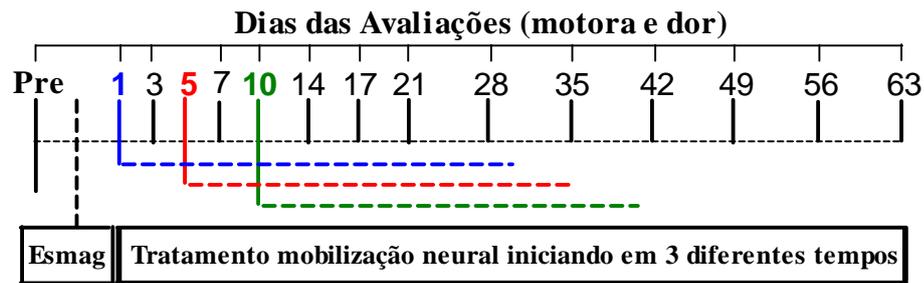


Figura 10. Linha temporal indicando os dias dos procedimentos experimentais. O tratamento teve início em 3 tempos diferentes: 1, 5 e 10 dias após o esmagamento. Mobilização neural passiva foi realizada em dias alternados por 30 dias, totalizando 15 sessões com duração de 9 minutos cada. Esmagamento (Esmag.)

3.4.1 Coleta e análise das imagens

3.4.1.1 Pista de análise da marcha

Foi utilizada para a coleta de dados dos IFC e IEC uma pista de marcha de madeira e vidro, com 42 x 8,5 x 9cm para as proteções laterais. O fundo da pista foi feito de vidro, sendo que abaixo do mesmo havia um espelho em um ângulo de 45° de inclinação conforme descrito (VAREJÃO et al., 2001b; WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1990) (Figura 11). Uma lâmpada de 100 W, foi posicionada com o foco direcionado para o espelho, iluminando a imagem das pegadas do animal. No final do corredor, havia uma caixa escura para induzir o animal a caminhar na direção da mesma.



Figura 11. Pista utilizada para obtenção das imagens da vista inferior dos animais.

3.4.1.2 Obtenção e análise das imagens

A captura das imagens da marcha dos animais foi obtida através de uma câmera filmadora digital da marca Panasonic PV-GS19 Mini DV, posicionada a 1 metro de distância da pista de marcha, a qual gravou as imagens em fita mini DV. As capturas das imagens das pegadas dos ratos foram feitas enquanto o animal caminhava sobre a pista de marcha, através do espelho colocado embaixo da pista num ângulo de 45° de inclinação. Nas capturas das imagens do animal em repouso, o mesmo foi mantido restrito na própria pista de marcha, possibilitando a captura das imagens dele em posição estática (Figura 12 à direita).



Figura 12. Imagens da vista inferior do animal. Durante a marcha (esquerda), e em repouso (direita).

Através do programa “movie maker” versão 2.0, as filmagens foram armazenadas (formato jpeg, 640 x 480 pixels / polegadas, taxa de amostragem 1096 K bps) e escrutinadas “off-line”. Esta etapa consistiu no isolamento de diversos quadros, contendo os momentos de interesse para a análise de marcha dos ratos. Os quadros de interesse foram exportados para o programa “Image Pro Plus” (versão 6.0, National Institute of Health) para o cálculo dos parâmetros PL (comprimento da pegada), TS (abertura total dos dedos) e IT (abertura dos dedos intermediários) do IFC e do TS e IT para o cálculo do IEC.

3.4.2 Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático do Ciático (IEC)

Através das imagens obtidas por vídeo, os seguintes parâmetros foram mensurados: (1) comprimento da pegada (PL, do inglês, print length), a qual depende da ativação do músculo gastrocnêmio; (2) abertura total dos dedos, do 1º ao 5º (TS, do inglês, total spread of toes); e (3) a abertura dos dedos intermediários, do 2º ao 4º (IT, do inglês, intermediate toes),

os quais são influenciados pelos músculos extensores e intrínsecos da pata (BAIN et al, 1989). Estes dados foram coletados do lado normal (não-operado) (NPL, NTS e NIT) e do lado experimental (operado) (EPL, ETS e EIT) (Figura 13). Posteriormente, os dados obtidos foram analisados através da equação desenvolvida por De Medinaceli et al. (1982) e adaptada por Bain et al. (1989) e Hare et al. (1992).

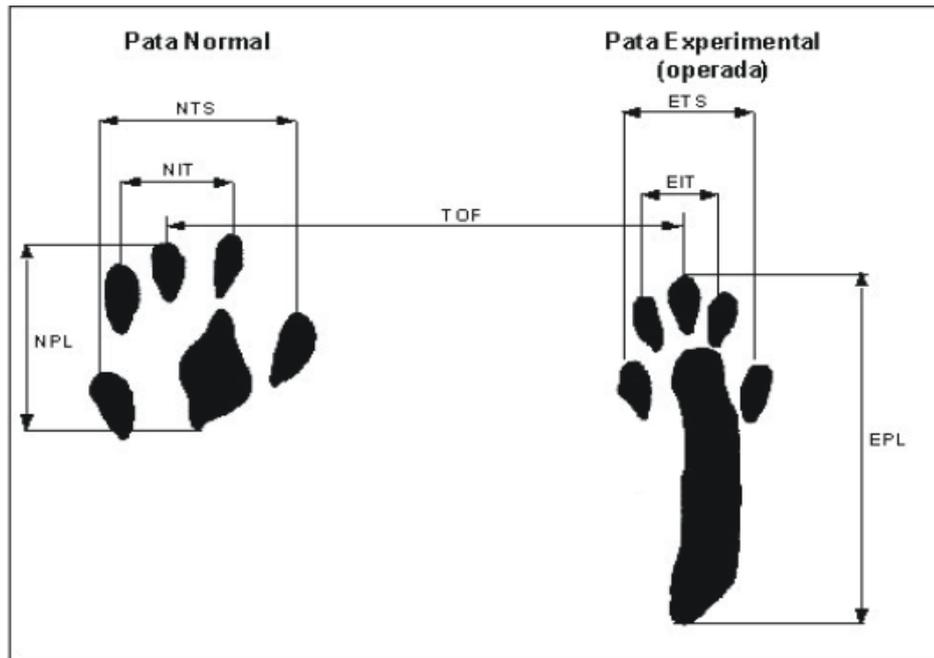


Figura 13. Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o índice funcional do ciático (IFC). N: normal; E: experimental (operada); TS: abertura total dos dedos (1º ao 5º); IT: abertura dos dedos intermediários (2º ao 4º); PL: comprimento da pegada. **Fonte:** Raso, 2002.

$$\text{Fator abertura total dos dedos (TSF)} = \frac{(ETS - NTS)}{NTS} \quad \dots(1)$$

$$\text{Fator abertura dos dedos intermediários (ITSF)} = \frac{(EIT - NIT)}{NIT} \quad \dots(2)$$

$$\text{Fator comprimento da pegada (PLF)} = \frac{(EPL - NPL)}{NPL} \quad \dots(3)$$

O IFC foi calculado como descrito por Bain et al. (1989), de acordo com a seguinte equação:

$$\text{IFC} = -38,3 \frac{(EPL - NPL)}{NPL} + 109,5 \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + 13,3 \frac{(EIT - NIT)}{NIT} - 8,8 \quad \dots(4)$$

$$= (-38,3 \times \text{PLF}) + (109,5 \times \text{TSF}) + (13,3 \times \text{ITSF}) - 8,8 \quad \dots(5)$$

Foi demonstrado que em condições dinâmicas, o PL, a TS e a IT possuem significância estatística, enquanto que em condições estáticas apenas a TS e a IT apresentam-se significativos estatisticamente. Baseado nestes resultados, introduziu-se outro modelo de avaliação denominado “Índice Estático do Ciático” (IEC), o qual é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{IEC} = [(108,44 \times \text{TSF}) + (31,85 \times \text{ITSF})] - 5,49 \quad \dots(6)$$

Para calcular o índice estático do ciático, os animais estavam sempre em repouso e somente os parâmetros de TS e ITS foram mensurados como descrito por Bervar (2000). Ambos IFC e IEC são negativos (o valor normal é igual a zero), significando ausência de disfunção do nervo. Já a disfunção total é igual a menos cem (-100), significando completa disfunção, de modo que quanto mais próximo de zero melhor a função do nervo (BAIN et al., 1989). Cada imagem da superfície ventral do animal foi analisada por um único observador, sendo que a média de três mensurações foram utilizadas para calcular o IFC e o IEC, como descrito por De Medinaceli et al. (1982).

3.4.3 Avaliação da função sensorial (parâmetros experimentais relacionados à dor)

Estímulos térmicos e mecânicos foram utilizados para avaliar a função sensorial. Nesta avaliação, os animais foram previamente habituados em caixas individuais de observação. mínimo de 15 minutos ou até que os comportamentos de exploração do ambiente terminassem. Na realização dos testes, os animais permaneceram livres nas caixas de observação, sem a necessidade da manipulação pelo experimentador. As respostas à estimulação térmica ou mecânica foram testadas no dia anterior ao procedimento cirúrgico basal (pré-esmagamento) e repetidamente em diferentes intervalos de tempo, como mostra a figura 10.

3.4.3.1 Alodinia mecânica (von Frey)

A frequência de resposta frente a um estímulo mecânico foi avaliada com um método adaptado daquele descrito por Bortolanza et al. (2002). A alodinia mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de von Frey (6 g). O teste consistiu na aplicação do filamento na pata, com a duração de 5 segundos, por 10 vezes. Foi considerada resposta positiva (RP) o

levantamento da pata posterior operada (direita) que foi estimulada. O resultado deste teste foi dado em porcentagem

No dia anterior à cirurgia, os animais foram submetidos ao teste de von Frey (6 g). Para caracterização da resposta basal, foram selecionados apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta de no máximo 20%.



Figura 14. Aplicação do filamento de von Frey.

A aplicação do filamento de von Frey foi executada utilizando-se uma plataforma construída especialmente para este teste (PITCHER et al., 1999). A plataforma (70 x 40 cm) consistiu de uma tela de arame com malha de 6 mm (Figura 14). Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberta com tampa que estava posicionada sobre a plataforma.

O filamento foi aplicado atendendo a alguns critérios como: (1) a aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar (Figura 14); (2) a pressão foi suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; (3) os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; e (4) a resposta de retirada da pata foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio. Estas avaliações foram realizadas nos respectivos dias mostrados na figura 10.

3.4.3.2 Alodinia ao frio (acetona)

A alodinia ao frio foi avaliada usando o teste da acetona como descrito por Choi et al. (1994). O teste consistiu na aplicação (seringa de insulina) de 100 μ L de acetona na superfície

ventral da pata posterior operada (direita) do animal (Figura 15). Tomou-se o cuidado para evitar o contato da agulha com a pata. Foi analisada a resposta dentro de 20 s após a aplicação da acetona e registrada em escores como:

- (0) – nenhuma resposta;
- (1) - uma levantada ou sacudida rápida da pata;
- (2) - duas ou mais levantadas ou sacudidas rápidas da pata e
- (3) - períodos de levantadas ou sacudidas rápidas da pata associados com lambidas na pata posterior (FLATTERS; BENNETT, 2004).

A aplicação da acetona foi repetida três vezes, com intervalos de 5 minutos entre elas, para cada animal. A soma dos três escores foi usada para análise dos dados (FLATTERS; BENNETT, 2004). Estas avaliações foram realizadas nos respectivos dias mostrados na figura 10.



Figura 15. Aplicação da acetona.

3.4.4 Análise histológica e morfométrica

3.4.4.1 Preparação das amostras

Todos os processos de análise histológica e morfométrica foram realizados no Laboratório de Marcadores Histo-Citológicos do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC.

Na 8ª semana após o esmagamento do nervo ciático, os ratos foram eutanasiados na câmara de CO₂. O nervo ciático foi retirado através de uma nova incisão no mesmo local da utilizada no procedimento inicial. As amostras foram fixadas em uma solução de formalina-zinco (cloreto de zinco 1,6%, formaldeído 4%, acetato de cálcio 20%) durante 24 h. Após a fixação, as amostras foram colocadas em dicromato de potássio a 5% por 5 dias. Passado esse período, as amostras foram lavadas em água corrente e deixadas na água por toda noite para retirar todo o dicromato antes da desidratação gradual com etanol.

Em seguida, foi seccionado um segmento do nervo de 5 mm, 3 mm distalmente à lesão. Depois de uma cuidadosa desidratação em etanol, utilizou-se a metodologia de rotina (Cargnin-Ferreira; Sarasquete), para a inclusão em parafina 58°C, utilizando como líquido intermediário o xilol e levando a cabo os seguintes passos:

Desidratação e inclusão em parafina: Etanol 70% (mínimo 24 horas), Etanol 80% (45 minutos), Etanol 90% (45 minutos), Etanol absoluto 100% I (45 minutos), Etanol absoluto II (45 minutos), Etanol-Xilol 1/1 (45 minutos), Xilol I (45 minutos), Xilol II (45 minutos), Parafina I (1 hora), Parafina II (1 hora), Parafina III (1 hora).

Uma vez o material incluído verticalmente em parafina e feitos seus blocos, os mesmos foram cortados em um micrótomo Leica RM 2025 com espessura de 5 µm. Os cortes foram então estirados e recolhidos em um banho termostático a 52°C e dispostos sobre lâminas gelatinizadas para sua fácil adesão.

3.4.4.2 Técnicas histomorfológicas

Os cortes obtidos foram desparafinizados e hidratados segundo a metodologia de rotina e corados com a técnica de Cason (CARGNIN-FERREIRA & SARASQUETE, 2008) e “Oil Red” (KIERNAN, 2004). As preparações histológicas foram dispostas numa solução de Orange G (1%), Fucsina Ácida (1%), Azul de Anilina (1%) e ácido fosfotúngstico (1%) durante 5 minutos e depois em solução hidroalcolica “Oil Red” (1%) por 1 minuto. Passado esse tempo, as lâminas foram então lavadas para retirada do excesso de corante, desidratadas e montadas em meio de montagem aquoso.

O uso desta técnica em detrimento da coloração bicromática hematoxilina-eosina radica no fato de que técnicas tricrômicas, como a usada neste trabalho, evidenciam sobremaneira compostos protéicos e glicídicos assim como estruturas morfológicas similares com cores distintas, aumentando os contrastes e evidenciando melhor as estruturas analisadas.

3.4.4.3 Tratamento das imagens

A análise histológica foi realizada em corte transversal da porção distal do nervo direito restrita ao tecido conjuntivo e à área de bainha mielinizada. As imagens foram adquiridas usando-se uma câmera digital de microscopia modelo TA – 0124-A, conectada a um microscópio de luz DME (Leica). As imagens foram capturas em aumento de 1000x e ampliada mais 200x para análise, pelo Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland).

Posteriormente, as imagens foram analisadas em um programa de imagem (Chtool) desenvolvido pelo Projeto Cyclops (Depto. de Informática – UFSC) para análises histopatológicas dos projetos desenvolvidos pelo Dr. Eduardo Cargin Ferreira e para o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário.

Contrariamente aos procedimentos em análises de imagens histológicas, onde se convertem as imagens policromáticas em uma escala de cinza e se analisam quantitativamente áreas de interesse, o programa atualmente desenvolvido analisa as imagens policromáticas diretamente, o que leva a uma maior precisão nas quantificações planimétricas das alterações histopatológicas porque integram distintos matizes de cor derivados das técnicas de coloração utilizadas.

3.4.4.4 Morfometria

Para a análise morfométrica foram selecionados os melhores cortes, pela microscopia de pequeno aumento, descartando os cortes de má qualidade os quais poderiam prejudicar o processo de medida dos parâmetros. Os critérios de seleção dos cortes foram a integridade da morfologia do nervo, particularmente do perineuro, qualidade da coloração, ausência de artefatos de técnicas (rachaduras, dobras).

Depois de corados, os cortes foram observados e fotografados com microscopia de luz e uma série de 5 parâmetros foram quantificados: (1) densidade de fibras mielinizadas (fibras/mm²) (Figura 16B) e (2) espessura da bainha de mielina (µm) foi realizada com um aumento de 1000x. Para este último parâmetro, foi escolhida uma área representativa, onde foram contados 10 axônios íntegros. (3) área de fibras mielinizadas (%) (Figura 16C); (4) área de tecido conjuntivo (%) (Figura 16D) neste parâmetro os fragmentos de degeneração foram subtraídos da imagem analisada, e (5) fragmentos de degeneração (%) (Figura 16G).

3.4.4.5 Controle de qualidade

Todo o estudo histológico, desde a biópsia até a análise das imagens obtidas a partir das preparações histológicas foram realizadas unicamente pelo aluno Daniel Fernandes Martins sob os auspícios do Dr. Eduardo Cargin-Ferreira do Laboratório de Marcadores Histo-Citológicos do Depto. de Biologia Celular, Embriologia e Genética (CCB-UFSC) com a finalidade de se evitar discordância entre examinadores (Índice de Kappa ≥ 70).

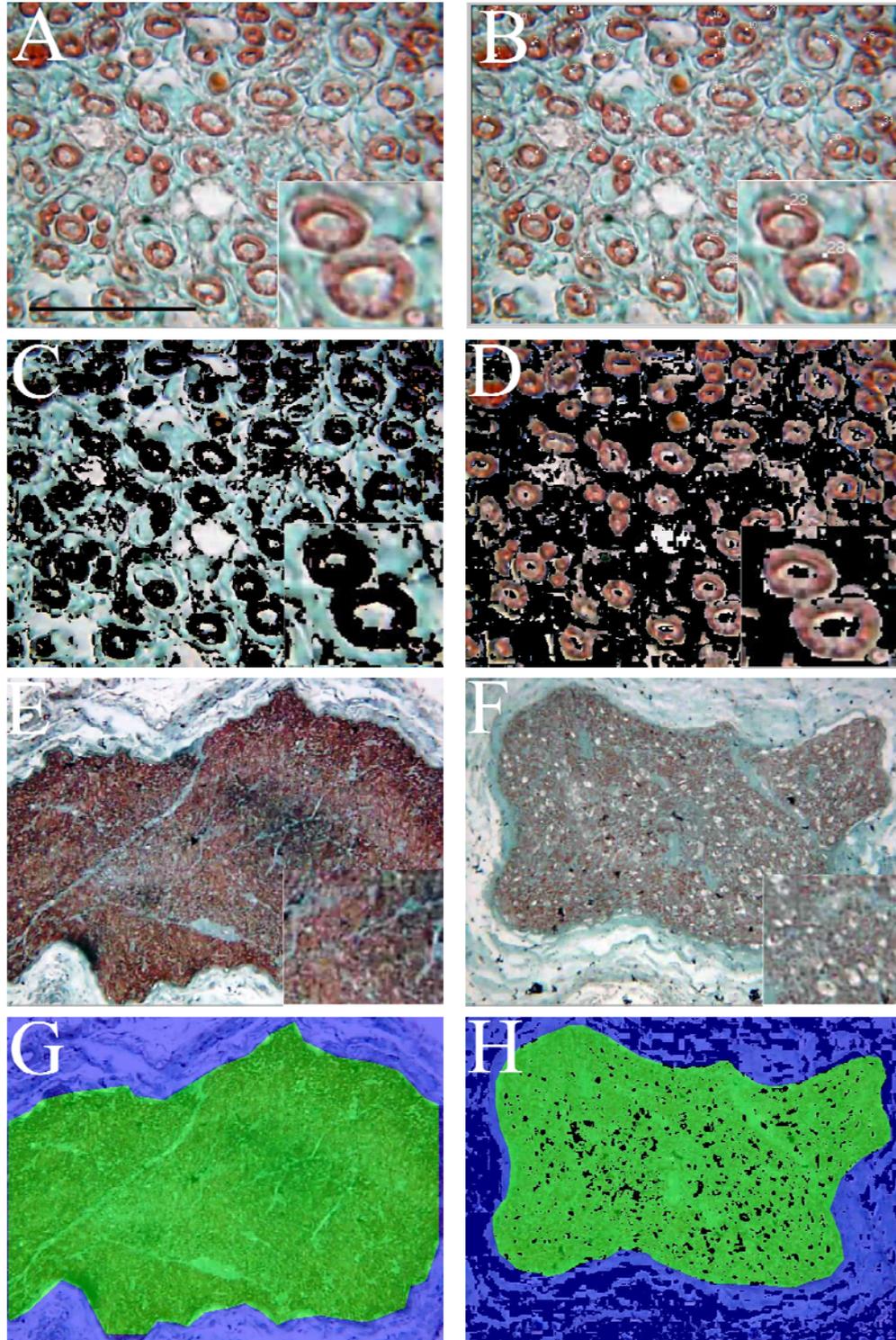


Figura 16. Imagens da análise morfométrica das secções transversais do nervo ciático de ratos 8 semanas após o esmagamento. (A) porção distal do nervo esmagado após 8 semanas do esmagamento no aumento de 1000x; (B) contagem dos axônios; (C) quantificação da área de fibras mielinizadas; (D) quantificação da área de tecido conjuntivo; (E) porção distal do nervo após 8 semanas do esmagamento no aumento de 100x, animal falso-operado (observar que não apresentam fragmentos de degeneração no meio do tecido); (F) porção distal do nervo esmagado após 8 semanas do esmagamento no aumento de 100x, animal operado (observar pontos brancos referentes a fragmentos de degeneração no meio do tecido); (G) Imagem do cortes sem a quantificação; (H) quantificação dos fragmentos de degeneração. As secções foram coradas com Cason e “oil red”. Barra da escala: 10 μ m.

3.5 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão das médias (EPM). Para análise dos dados da recuperação sensório motora (IFC, IEC, alodinia mecânica e ao frio), foi empregada Análise de Variância de duas vias (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni para múltiplas comparações. As análises estatísticas entre os grupos experimentais dos parâmetros morfométricos foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman Keuls. Em todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da mobilização neural sobre a recuperação funcional motora através do Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático do Ciático (IEC)

Na figura 17, observou-se que no grupo falso-operado a média do IFC permaneceu estável, próximo de -10%, que é considerado um valor normal (ausência de déficit motor) até a 8ª semana. No entanto, no grupo operado, observou-se que a média do IFC mudou de $-7,38 \pm 1,33\%$ no basal para $-95,78 \pm 0,82\%$ ($p < 0.001$; Fig. 17) no primeiro dia após o esmagamento, apresentando uma diferença de 88,4%. O IFC do grupo operado controle ($-21,67 \pm 4,31\%$) alcançou um valor correspondente à função normal do nervo somente no 28º dia após o esmagamento, igualando-se ao valor do IFC do grupo falso-operado ($-11,86 \pm 2,30\%$, Fig.17).

No grupo operado (com o nervo ciático esmagado) houve perda da função do membro posterior analisado por 3 semanas ($p < 0.01$; Fig. 17) seguidas ao esmagamento, confirmando a indução da lesão pelo modelo adotado. Além disso, o grupo MN1d apresentou diferença estatisticamente significativa nas avaliações dos dias 7, 10, 14 e 17 ($-72,86 \pm 7,31\%$ $p < 0.001$; $-69,51 \pm 8,80\%$, $p < 0.001$; $-15,61 \pm 4,34\%$ $p < 0.001$ e $-6,34 \pm 1,71\%$, $p < 0.01$, nos respectivos valores do IFC) em relação aos valores do IFC do grupo operado ($-91,63 \pm 2,31\%$, $-86,14 \pm 4,59\%$, $-52,90 \pm 3,91\%$ e $-27,87 \pm 3,96\%$, Fig. 17, respectivamente) estes resultados indicaram que a recuperação da função motora do grupo MN1d foi acelerada a partir do 7º dia em relação ao grupo operado.

No entanto, os valores do IFC dos grupos operado, MN5d e MN10d foram semelhantes durante todo o período experimental, alcançando os valores do IFC do grupo falso-operado na 4ª semana após o esmagamento (Figura 17).

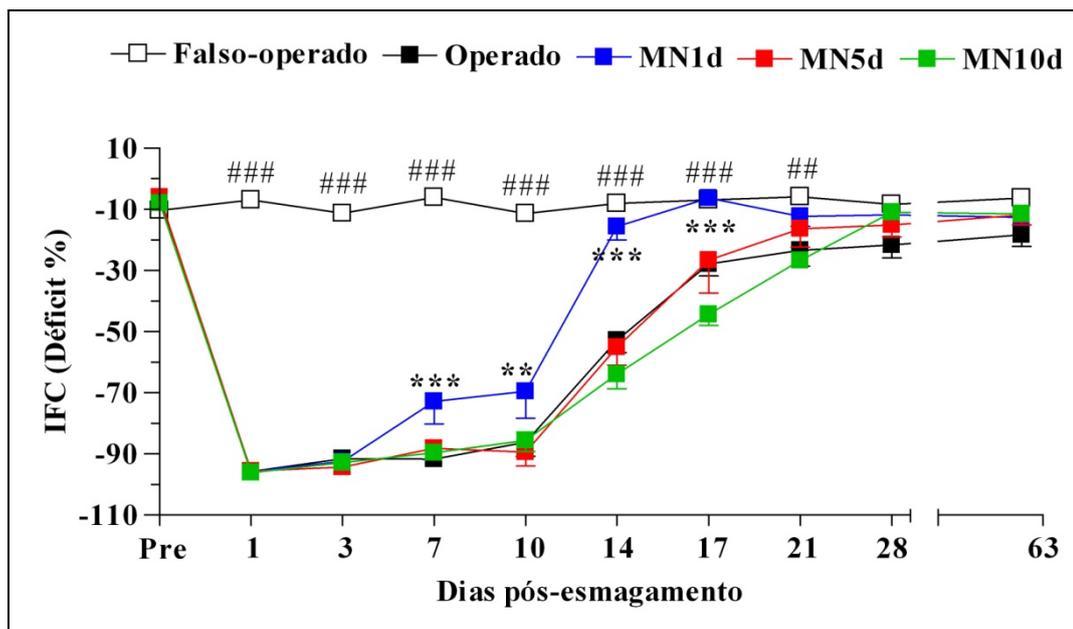


Figura 17. Efeito da mobilização neural sobre recuperação funcional motora avaliada através do (IFC). O gráfico mostra a avaliação antes e após o esmagamento do nervo - Pré (basal) e a cada 3-4 dias até a 3ª semana e posteriormente uma vez por semana até a 8ª semana após o procedimento cirúrgico. MN1d = tratamento com mobilização neural iniciado no 1º dia após o esmagamento; MN5d = tratamento com mobilização neural iniciado no 5º dia após o esmagamento e MN10d = tratamento com mobilização neural iniciado no 10º dia após o esmagamento. Os grupos falso-operado e operado foram comparados com os grupos tratados: MN1d, MN5d e MN10d. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (*) representa a comparação entre os grupos tratados em relação ao grupo operado; (#) denota a comparação entre os grupos falso-operado e operado. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ### $p < 0.01$, #### $p < 0.001$.

Na figura 18, o grupo falso-operado apresentou o valor médio do IEC próximo de -10%, com mínima variação ao longo do período experimental. Este valor do IEC, igualmente ao IFC, é considerado um valor de atividade motora normal. Porém, no grupo operado a média do IEC apresentou consideráveis mudanças de $-6,57 \pm 2,32\%$ ($p < 0.001$; Fig. 18) no basal para $-95,71 \pm 1,06\%$ no primeiro dia após o esmagamento apresentando uma diferença de 89,13%. Este valor do IEC no primeiro dia após o esmagamento representa total perda da função motora no membro em que o nervo ciático foi esmagado. O grupo operado permaneceu com déficit até a 3ª semana ($-19,33 \pm 4,10\%$, $p < 0.01$) e sua total função motora retornou a valores próximos aos do grupo falso-operado ($-7,18 \pm 1,37\%$, Fig. 18) apenas no 28º dia pós-esmagamento ($15,15 \pm 3,17\%$). Estes resultados reforçam os dados encontrados no IFC, indicando a perda da função do membro posterior analisado dos animais do grupo operado por 3 semanas seguidas ao esmagamento.

Além disso, o grupo MN1d nas avaliações do IEC nos dias 7 e 17 ($-78,24 \pm 11,28\%$, $-7,18 \pm 1,37\%$, $p < 0.05$, Fig. 18, respectivamente) apresentou significativo aumento em relação

aos valores do grupo controle ($-98,20 \pm 0,81\%$ e $-26,40 \pm 8,90\%$, respectivamente) exibindo recuperação motora precoce.

Nos grupos MN5d e MN10d, observou-se comportamento semelhante ao grupo operado durante todo o período experimental, alcançando os valores do IEC do grupo falso-operado na 4ª semana após o esmagamento (Figura 18).

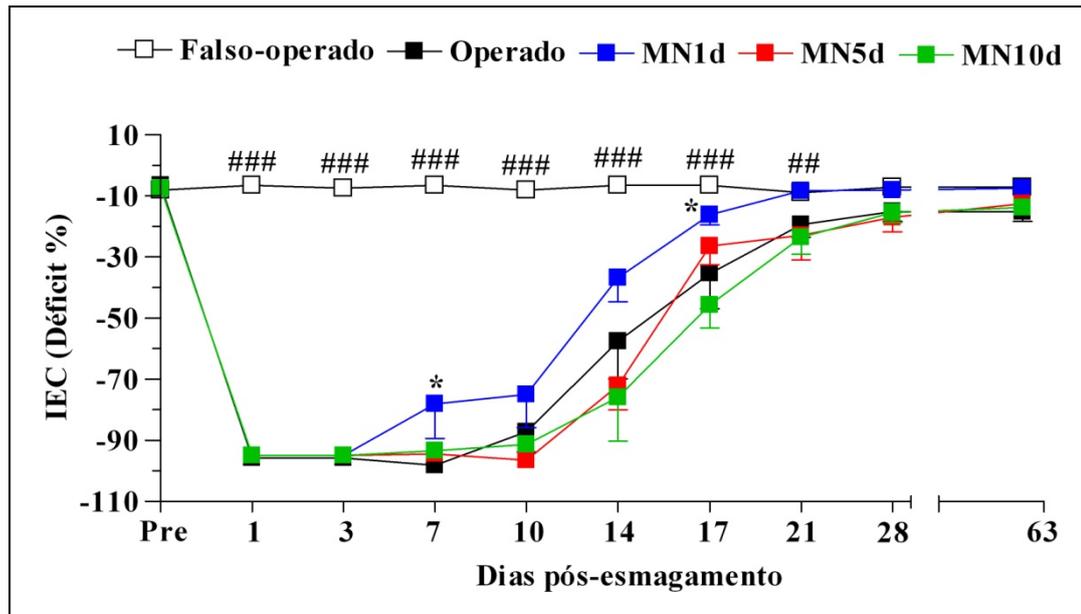


Figura 18. Efeito da mobilização neural sobre a recuperação funcional motora avaliada através do (IEC). O gráfico mostra a avaliação antes e após o esmagamento do nervo - Pré (basal) e a cada 3-4 dias até a 3ª semana e posteriormente uma vez por semana até a 8ª semanas após o procedimento cirúrgico. MN1d = tratamento com mobilização neural iniciado no 1º dia após o esmagamento; MN5d = tratamento com mobilização neural iniciado no 5º dia após o esmagamento e MN10d = tratamento com mobilização neural iniciado no 10º dia após o esmagamento. Os grupos falso-operado e operado (N = 8) foram comparados com os grupos tratados: MN1d, MN5d e MN10d. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (*) representa a comparação entre os grupos tratados em relação ao grupo operado; (#) denota a comparação entre os grupos falso-operado e operado. * $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

4.2 Efeito da mobilização neural sobre a recuperação funcional sensorial através da avaliação da alodinia mecânica e ao frio

Na avaliação basal e 3 dias após o esmagamento observou-se mudança significativa no limiar sensorial mecânico dos animais, os quais apresentavam uma frequência média de retirada de $5,71 \pm 2,02\%$, (Fig.19) e passaram a apresentar $40,00 \pm 6,90\%$, ($p < 0.001$, Fig.19). Esta diminuição no limiar sensorial frente à estimulação mecânica se manteve ao longo de 17 dias ($p < 0.001$) e somente voltou ao normal na 3ª semana após o esmagamento. Estes resultados mostraram que o modelo adotado no presente estudo induziu dor neuropática periférica (alodinia mecânica). Além disso, não foi observada mudança significativa nos

valores da frequência média de retirada da pata dos animais do grupo falso-operado durante o período experimental, indicando que a neuropatia foi induzida pelo esmagamento e não pelo procedimento operatório (incisões e suturas fasciais e musculares).

O tratamento MN1d foi capaz de evitar o desenvolvimento da alodinia mecânica no respectivo grupo. Sendo assim, os valores da frequência média de retirada da pata nos dias 3 ($11,25 \pm 5,80\%$), 7 ($15 \pm 7,07\%$), 10 ($8,75 \pm 3,98$), 14 ($6,25 \pm 3,23\%$) e 17 ($7,5 \pm 2,5$) foram menores que os valores observados no grupo controle ($40,00 \pm 6,90\%$; $35,71 \pm 6,11\%$, $62,86 \pm 9,93\%$; $40,00 \pm 12,25\%$ e $50 \pm 6,83\%$) ($p < 0.001$, nos respectivos dias) (Figura 19).

Além disso, depois de instalada a alodinia mecânica, o tratamento MN5d foi capaz de inibir a alodinia avaliada nos dias 10, 14 e 17 (inibindo $44,19\%$; $35,71\%$ e $34,29\%$, $p < 0.001$, respectivamente) (Figura 19) em relação o grupo operado. No tratamento realizado mais tardiamente (MN10d), também foi observado comportamento anti-alodínico em relação ao grupo controle. A partir do início deste tratamento, as inibições foram de $47,15\%$; $34,28\%$ e $44,28\%$, $p < 0.001$ nas avaliações dos dias 10, 14 e 17, respectivamente (Figura 19).

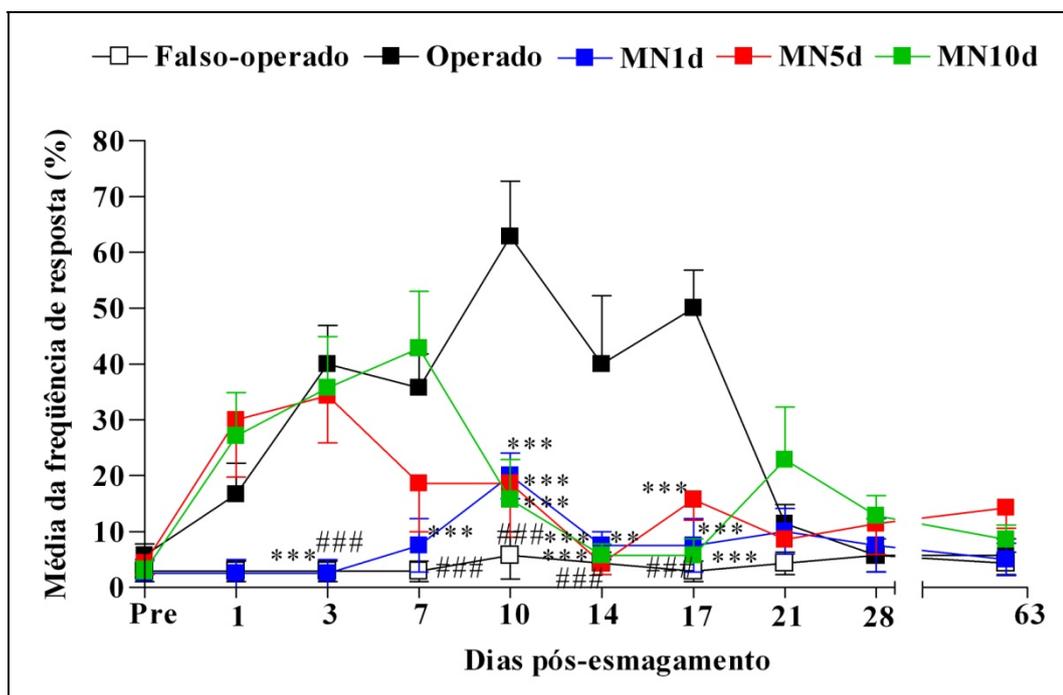


Figura19. Efeito da mobilização neural sobre a alodinia mecânica. O gráfico mostra a avaliação antes e após o esmagamento do nervo - Pré (basal) e a cada 3-4 dias até a 3ª semana e posteriormente uma vez por semana até a 8ª semana após o procedimento cirúrgico. MN1d = tratamento com mobilização neural iniciado no 1º dia após o esmagamento; MN5d = tratamento com mobilização neural iniciado no 5º dia após o esmagamento e MN10d = tratamento com mobilização neural iniciado no 10º dia após o esmagamento. Os grupos falso-operado e operado foram comparados com os grupos tratados: MN1d, MN5d e MN10d. Os dados são expressos como porcentagem (média \pm EPM) dos ensaios, N = 8 animais. (*) representa a comparação entre os grupos tratados em relação ao grupo operado; (#) denota a comparação entre os grupos falso-operado e operado. *** $p < 0.001$, #### $p < 0.001$.

No teste de alodinia ao frio, observou-se que o estímulo realizado pela acetona inicialmente exibiu mínimo desconforto nos animais, evidenciado pela média da soma dos escores do grupo operado ($0,28 \pm 0,18$) (Figura 20). No entanto, quando os animais foram submetidos ao esmagamento do nervo ciático, os mesmos passaram a apresentar no 1º dia após o esmagamento o valor de $7,0 \pm 0,43$ ($p < 0.001$, Fig. 20). Estes dados mostraram que o esmagamento do nervo foi capaz de induzir alodinia ao frio, visto que o estímulo térmico que inicialmente era inócua passou a ser nocivo frente à mudança no limiar sensorial dos animais. Esta mudança no limiar foi observada até o final do experimento, na 8ª semana. Porém, apenas o grupo MN1d foi capaz de inibir a alodinia ao frio (inibição de 51,32%), mas somente no 3º dia ($4,25 \pm 0,72$, $p < 0.001$, Fig. 20).

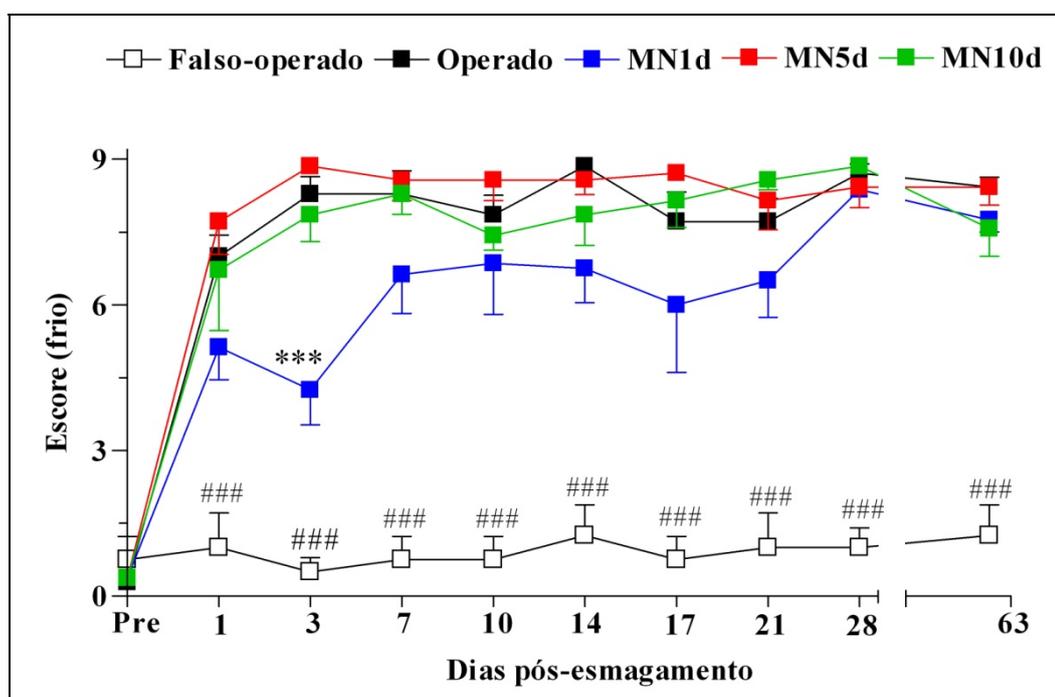


Figura 20. Efeito da mobilização neural sobre a alodinia ao frio. O gráfico mostra a avaliação antes e após o esmagamento do nervo - Pré (basal) e a cada 3-4 dias até a 3ª semana e posteriormente uma vez por semana até a 8ª semana após o procedimento cirúrgico. MN1d = tratamento com mobilização neural iniciado no 1º dia após o esmagamento; MN5d = tratamento com mobilização neural iniciado no 5º dia após o esmagamento e MN10d = tratamento com mobilização neural iniciado no 10º dia após o esmagamento. Os grupos falso-operado e operado foram comparados com os grupos tratados: MN1d, MN5d e MN10d. Os dados são expressos como média da soma de cada animal (média \pm EPM) dos ensaios, N = 8 animais. (*) representa a comparação entre os grupos tratados em relação ao grupo operado; (#) denota a comparação entre os grupos falso-operados e operados. *** $p < 0.001$, #### $p < 0.001$.

4.3 Análise histológica e morfométrica

A análise morfométrica das imagens dos cortes transversais da porção distal do nervo ciático (Figura 21 e 22) demonstrou que na 8ª semana após o esmagamento, o grupo falso-operado teve média de 28.686 ± 1.844 fibras/mm² (Figs. 21 e 22A), No entanto, o grupo operado (controle) apresentou média de 14.629 ± 3.302 fibras/mm² ($p < 0.01$, Figs. 21B e 22A) na densidade de fibras mielinizadas, sendo os dois grupos estatisticamente diferentes. Além disso, os grupos MN1d e MN10d que foram submetidos ao esmagamento também apresentaram uma menor densidade de fibras mielinizadas (17.886 ± 1.177 e 19.357 ± 3.820 fibras/mm² respectivamente) (Figuras 21C e 22A; 21E e 22A) em comparação ao grupo falso-operado ($p < 0.01$). Entretanto, foi observado que o grupo MN5d apresentou maior densidade de fibras mielinizadas do que os grupos operado, MN1d e MN10d (24.429 ± 1.284 fibras/mm²; $p < 0.05$) (Figs. 21D e 22A).

A espessura média da bainha de mielina encontrada no grupo operado foi $0,80 \pm 0,04$ μm ($p < 0.001$, Figs. 21B e 22B) que diferiu estatisticamente da média do grupo falso-operado ($1,75 \pm 0,04$ μm , Figs. 21A e 22B). Entretanto, no grupo MN1d observou-se uma maior espessura da bainha de mielina ($1,05 \pm 0,05$ μm , $p < 0.05$) (Figs. 21C e 22B) do que no grupo operado. Os grupos MN5d ($0,93 \pm 0,05$ μm) (Figs. 21D e 22B) e MN10d ($0,90 \pm 0,03$ μm) (Figs. 21E e 22B) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo operado.

A área de fibras mielinizadas foi estatisticamente diferente entre a porcentagem do grupo operado ($16,25 \pm 4,13\%$, $p < 0.001$) (Figs. 21B e 22C) e a porcentagem do grupo falso-operado ($46,0 \pm 5,41\%$, Figs. 21A e 22C). Os grupos MN1d ($18,92 \pm 1,49\%$, Figs. 21C e 22C), MN5d ($26,02 \pm 3,15\%$ Figs. 21D e 22C) e MN10d ($25,0 \pm 4,07\%$) (Figs. 21E e 22C) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo operado.

O grupo operado apresentou maior porcentagem de área de tecido conjuntivo ($67,20 \pm 5,06\%$, $p < 0.05$, Figs. 21B e 22D) do que o grupo falso-operado ($46,0 \pm 1,68\%$, Figs. 21A e 22D). Os grupos MN1d ($62,89 \pm 2,87\%$), MN5d ($61,63 \pm 4,37\%$) e MN10d ($61,51 \pm 5,36\%$, Figuras 21C-21E e 22D, respectivamente) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo operado.

O grupo operado apresentou maior porcentagem de fragmentos de degeneração ($11.1 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$; Figs. 21B e 22E) do que o grupo falso-operado, o qual não apresentou fragmentos de degeneração (0%, Figs. 21A e 22E). Também não foram observadas diferenças

significativas entre os grupos operado, MN1d ($10,37 \pm 2,38\%$), MN5d ($6,81 \pm 1,68\%$) e MN10d ($9,6 \pm 2,53\%$, (Figuras 21C-21E e 22E, respectivamente).

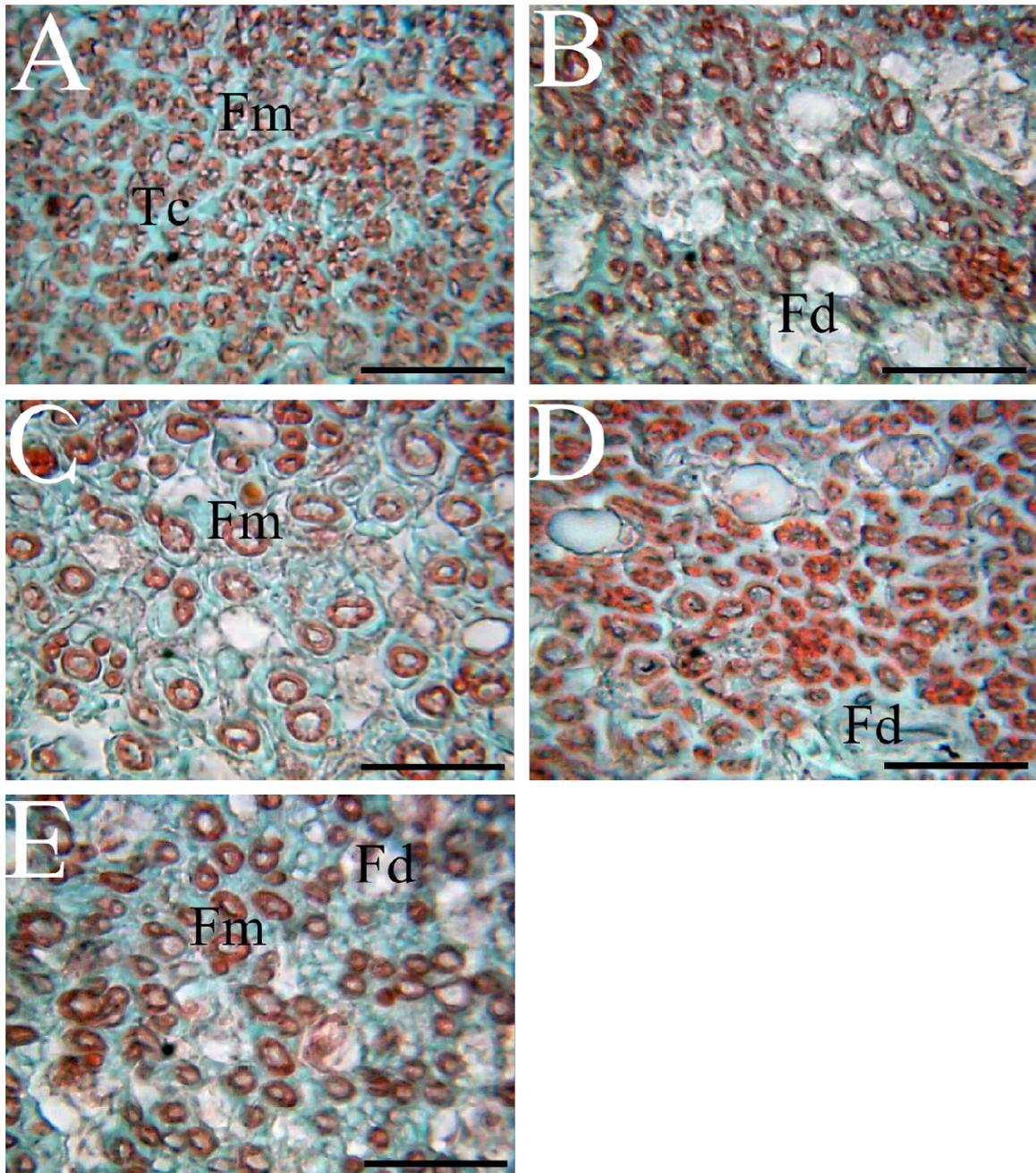


Figura 21. Imagens de secções transversas da porção distal do nervo ciático de ratos 8 semanas após o esmagamento. (A) nervos normais do grupo falso-operado. Observar as fibras mielinizadas grandes e pequenas e o escasso espaço de tecido conjuntivo endoneural entre as fibras mielinizadas. (B) grupo operado mostrando a predominância de fibras mielinizadas de pequeno diâmetro. Notar também o aumento do tecido conjuntivo endoneural (Tc) entre as fibras do nervo e a presença de fragmentos de degeneração (Fd). (C) grupo MN1d mostrando o nervo regenerado. As fibras mielinizadas são similares ao grupo falso-operado, diferindo dos outros grupos experimentais. Notar a presença de fibras pequenas e grandes com grande espessura da bainha de mielina (Fm). Ademais, o aumento do tecido conjuntivo endoneural entre as fibras mielinizadas e a presença de fragmentos de degeneração parece menor que o grupo operado. (D) Nervos do grupo MN5d mostrando a predominância de fibras de pequeno diâmetro e pouco mielinizadas. Notar o aumento de tecido conjuntivo endoneural entre as fibras do nervo e a presença de fragmentos de degeneração. (E) O grupo MN10d mostrou predominância de fibras de pequeno diâmetro e pouco mielinizadas. Observar o aumento de tecido conjuntivo endoneural entre as fibras do nervo e a presença de fragmentos de degeneração nesta porção. (Fm) indica fibras mielinizadas, (Tc) tecido conjuntivo endoneural, (Fd), fragmentos de degeneração. As secções foram coradas com Cason e “Oil Red”, Barra da escala: 10 μ m.

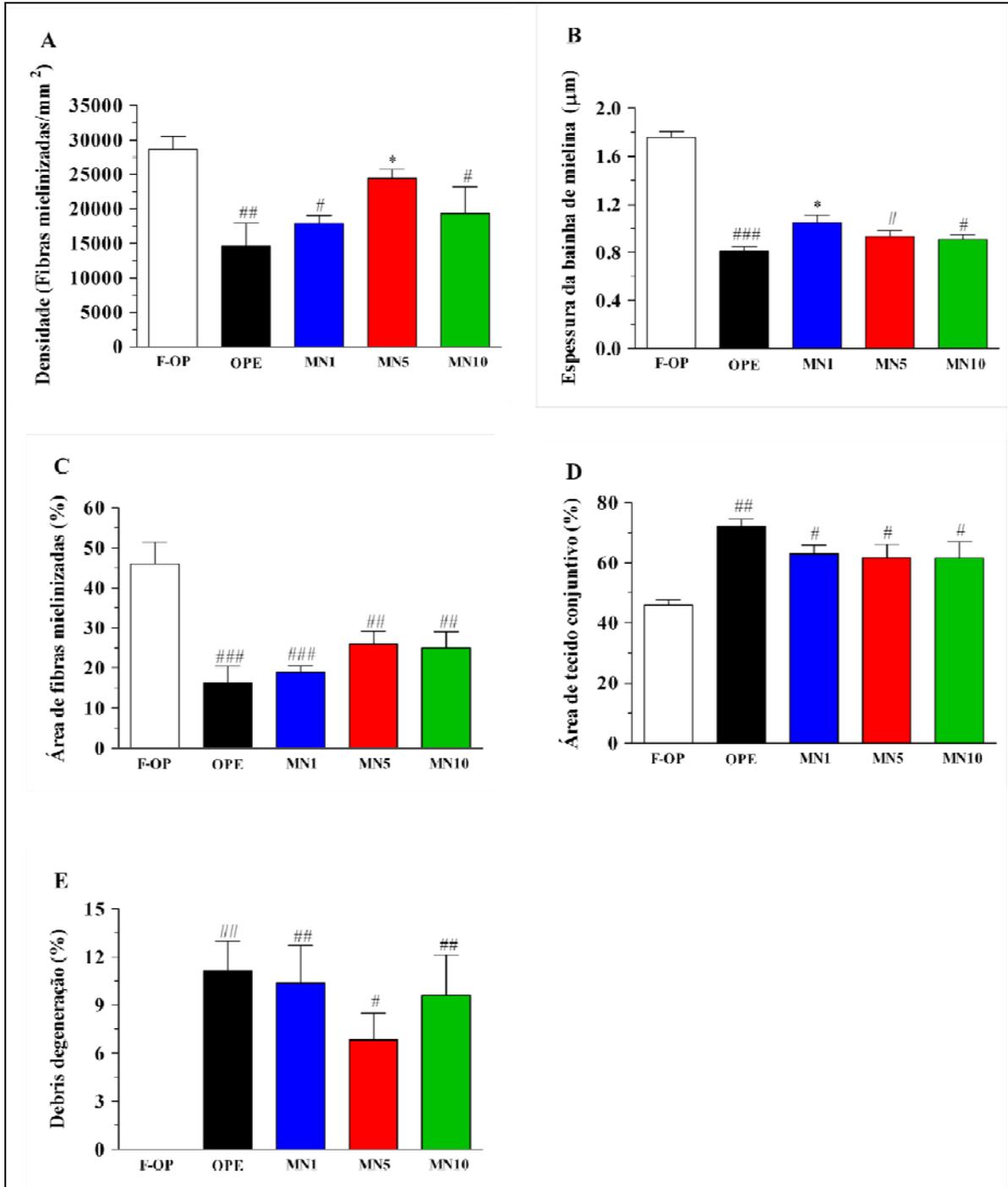


Figura 22. Efeito da mobilização neural sobre os parâmetros morfométricos da regeneração das fibras nervosas 8 semanas após o esmagamento. Os gráficos mostram: (A) densidade das fibras de mielina (Fibras mielinizadas/mm²); (B) média da espessura da bainha de mielina (µm); (C) porcentagem da área de fibras mielinizadas (%); (D) porcentagem da área de tecido conjuntivo (%) e (E) fragmentos de degeneração (%). Os dados são expressos como Média ± EPM, N = 5 animais. (#) quando comparado com o grupo falso-operado, (#) para $p < 0.05$, (##) para $p < 0.01$ e (###) para $p < 0.001$. (*) quando comparado com o grupo operado (*) para $p < 0.05$. F-OP = falso-operado; OPE = operado sem tratamento; MN1d = tratamento com mobilização neural iniciado no 1º dia após o esmagamento; MN5d = tratamento com mobilização neural iniciado no 5º dia após o esmagamento e MN10d = tratamento com mobilização neural iniciado no 10º dia após o esmagamento.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a mobilização neural do nervo ciático, através do teste modificado de elevação da perna estendida (EPE), pode influenciar o processo de regeneração do nervo ciático após lesão traumática. Os dados mais relevantes deste estudo foram: (1) o processo de regeneração do nervo ciático dos animais em que o tratamento iniciou no primeiro dia após a lesão foi acelerado, como observado pelo IFC e IEC. Além disso, a análise morfométrica evidenciou um aumento da espessura da bainha de mielina, observado no grupo MN1d e maior densidade de fibras mielinizadas, no grupo MN5d; (2) houve redução significativa na dor neuropática (alodinia mecânica) após o início do tratamento em todos os grupos tratados.

Os resultados apresentados aqui mostram pela primeira vez a mobilização neural precoce do nervo ciático sendo realizada no membro posterior de ratos. Ademais, este foi o primeiro trabalho que avaliou os efeitos da mobilização neural sobre a recuperação funcional sensorio-motora do nervo ciático de ratos submetidos à lesão traumática.

5.1 Lesão nervosa e avaliação da recuperação funcional motora

Roedores, particularmente ratos e camundongos, têm se tornado o modelo animal mais frequentemente utilizado para o estudo da regeneração de nervos pelo fácil manejo e pela distribuição de seus troncos nervosos, os quais são semelhantes aos humanos (MACKINNON et al., 1985; RODRIGUEZ et al., 2004). Ainda que lesões do nervo ciático em si sejam raras em humanos, este modelo experimental fornece uma avaliação muito realística das lesões envolvendo nervos plurifasciculados, com axônios de diferentes tamanhos e tipos, competindo para alcançar e reinervar o alvo distal (MACKINNON et al., 1985).

Lesão por esmagamento do nervo ciático também é um modelo de regeneração experimental bem estabelecido em estudos que investigam o impacto de vários tratamentos farmacológicos (AL MOUTAERY et al., 1998; GUDEMEZ et al., 2002). Além disso, este modelo tem sido utilizado em várias abordagens fisioterapêuticas que visam estimular a regeneração nervosa e aumentar a reinervação do órgão alvo (JAWEED et al., 1974; MATSUURA et al., 2001; RASO et al., 2005).

Uma lesão do tipo axonotmese, ou lesão de segundo grau de Sunderland, é caracterizada por colapso dos axônios e degeneração Walleriana distal. Não obstante, há preservação da continuidade da bainha endoneural. Neste sentido, após este tipo de lesão,

pode ser esperada regeneração espontânea ao longo do coto distal com bom retorno funcional (SEDDON, 1943, SUNDERLAND, 1990). Como o padrão de reinervação é semelhante ao original, o estudo desta lesão nervosa fornece um bom modelo para estabelecer a fisiopatologia da recuperação funcional do nervo.

Desde sua introdução por de Medinaceli et al. (1982), o IFC tem se tornado o suporte principal do arsenal para avaliar a recuperação funcional global após lesão do nervo ciático (VAREJÃO et al., 2001a,b). Após o esmagamento realizado por 30 segundos com o auxílio de uma pinça hemostática não-serrilhada (BRIDGE et al., 1994; VAREJÃO et al., 2004a), observa-se um déficit funcional completo em todos os animais. Subsequentemente, o IFC aumentou e o valor normal foi alcançado na 4ª semana. Nossos resultados referentes ao decurso temporal do IFC estão de acordo com os encontrados por vários autores, cujos estudos também demonstraram que o padrão normal da marcha é alcançado somente na 3ª ou 4ª semana (BRIDGE et al., 1994; HARE et al., 1992; WALKER et al., 1994a).

Em contraste aos nossos resultados, outros autores relataram que uma total recuperação é alcançada somente na 7ª semana ou após o primeiro mês seguido ao esmagamento do nervo ciático (VAREJÃO et al., 2004a, GUDEMEZ et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2001). Este resultado controverso da recuperação motora pode estar relacionado à resposta patofisiológica dos nervos frente às diferentes cargas de esmagamento aplicadas nos distintos estudos (LUNDBORG; DAHLIN, 1992; REMPEL et al., 1999).

A análise na pista de marcha é uma técnica amplamente aceita para avaliação funcional após reparo do nervo ciático em ratos, mas exige intenso trabalho. Em 2000, Bervar descreveu uma análise estática rápida, desenvolvendo um índice denominado Índice Estático do Ciático (IEC). O seu estudo mostrou que há boa correlação com o tradicional Índice Funcional do Ciático (IFC). Em nosso estudo, o valor do IEC após a lesão por esmagamento demonstrou um déficit completo em todos os animais, sendo esta mudança significativa até a 4ª semana, semelhante aos dados encontrados com o IFC.

5.2 Recuperação funcional sensorial

Nossos resultados referentes à alodinia mecânica estão de acordo com os resultados encontrados na literatura (CORONEL et al., 2008; NAIK et al., 2008). As lesões dos nervos causadas por trauma podem resultar em incapacidade. Os complexos distúrbios neuroquímicos e metabólicos envolvidos na patofisiologia das lesões dos nervos podem levar

ao desenvolvimento de dores crônicas, mais notavelmente a dor neuropática. Os marcadores da dor neuropática são dor espontânea e/ou sensibilidade aumentada à dor (por exemplo, uma resposta exagerada a um estímulo doloroso e/ou resposta dolorosa a um estímulo inócua mecânico ou térmico, hiperalgesia e alodinia, respectivamente). Os mecanismos que levam a alodinia/hiperalgesia neuropática ainda são pobremente compreendidos.

O modelo de lesão por esmagamento do nervo ciático tem sido amplamente usado nas duas últimas décadas, principalmente para avaliar o retorno da função motora. Sem embargo, só recentemente tem sido dado ênfase na avaliação da dor neuropática que se desenvolve com a lesão por esmagamento (CORONEL et al., 2008; NAIK et al., 2008; DECOSTERD et al., 2002; BESTER et al., 2000). A dor neuropática é uma queixa frequentemente observada pelos profissionais da saúde que estão em contato direto com pacientes acidentados (traumatizados). Além disso, os sintomas da neuropatia não respondem bem ao tratamento convencional com opióides (BENEDETTI et al., 1998; DELLEMIJN, 1999; CROSBY et al., 2000).

Neste sentido, é importante ressaltar que todos os grupos de tratamento apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Como observado, a mobilização neural quando iniciada precocemente, foi capaz de inibir o desenvolvimento da alodinia mecânica, mostrando grande efeito em todas as avaliações realizadas. A fora isto, os grupos tratados tardiamente também foram eficientes na redução da alodinia mecânica. Entretanto, os tratamentos com mobilização neural não foram eficazes na redução da alodinia ao frio, sugerindo assim que o mecanismo de ação anti-alodínico da mobilização neural é diferente para os dois estímulos utilizados.

5.3 Análise histológica e morfométrica

Do ponto de vista morfológico, a principal crítica que pode ser feita sobre o modelo de esmagamento do nervo está relacionada à possibilidade de que nem todas as fibras são estruturalmente danificadas pela lesão de esmagamento. Algumas fibras nervosas podem sofrer somente um prejuízo funcional temporário (lesão de grau 1 de Sunderland) e a recuperação funcional seguida pode não ser uma verdadeira regeneração de axônios lesionados. Apesar disto, os parâmetros morfométricos quantitativos do presente estudo sugerem que este problema não ocorreu, pois, após oito semanas do esmagamento, os dois grupos controles diferiram significativamente entre si (falso-operado e operado com o nervo ciático esmagado). Mostrou-se assim, a efetividade de esmagamento realizado pela pinça adotada.

No que diz respeito aos parâmetros morfométricos quantitativos, observações realizadas oito semanas após o esmagamento do nervo ciático mostraram que nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura (ILHA et al., 2008; VAREJÃO et al., 2004a) com exceção do parâmetro referente à densidade de fibras mielinizadas.

Em contraste à diminuição da densidade de fibras mielinizadas encontrada no presente estudo, Ilha et al. (2008) e Varejão et al. (2004b) observaram aumento da mesma. No entanto, trabalhos sugerem que este parâmetro não deve ser comparado entre estudos, porque a área de secção transversa do nervo analisada pode ser modificada por fatores indesejáveis e artefatos de técnicas. Assim, do mesmo modo que o edema aumenta o diâmetro do nervo e, conseqüentemente sua área de secção transversa, a preparação do segmento do nervo para as análises histológicas e morfométricas pode introduzir alterações (diminuição do diâmetro e sua área de secção transversa por retração), podendo falsear os resultados (BEHSE, 1990).

Por este motivo, devem ser evitadas comparações entre resultados obtidos em diferentes trabalhos. Entretanto, num trabalho onde a mesma metodologia for empregada para todos os grupos, as alterações exógenas introduzidas serão muito provavelmente as mesmas, tornando as comparações apropriadas entre os tratamentos.

5.4 Mobilização neural e degeneração Walleriana

Em relação aos resultados obtidos nos grupos tratados com mobilização neural, somente observou-se melhora em poucos parâmetros morfométricos. O aumento significativo na espessura da bainha de mielina do grupo MN1d em relação ao grupo operado, talvez possa explicar em parte os bons resultados apresentados pelo IFC deste grupo, o que sugere boa recuperação funcional.

Tem sido sugerido que a precisão do recrescimento é mais importante do que o vigor (THOMAS, 1970), e ainda, que a bainha de mielina juntamente com o diâmetro do axônio (parâmetro não avaliado em nosso estudo), são indicativos da qualidade do recrescimento, indicando o grau de maturação das novas fibras (DE MEDINACELI, 1995). Diante do exposto, sugere-se que o tratamento realizado no grupo MN1d pôde favorecer o recrescimento, fazendo com que os brotamentos alcançassem com maior precisão seus alvos originais e tornando a condução de impulsos nervosos mais rápida pelo aumento da espessura da bainha de mielina. No entanto, para confirmação destas sugestões novas pesquisas são necessárias.

De fato, tem sido observado que durante tratamentos clínicos de alongamento da perna os nervos não são funcionalmente danificados por alongamentos graduais na taxa de 1 mm/dia. Estas mudanças no comprimento dos nervos têm sido estudadas através de técnicas histológicas e eletrofisiológicas (ABE et al., 1996; IKEDA et al., 2000).

Tem sido mostrado o efeito do alongamento do nervo ciático de ratos sobre o aumento na produção de mielina nas fibras nervosas periféricas. Hara e colaboradores (2003) observaram um aumento na síntese do RNAm de uma das principais glicoproteínas da mielina, a proteína 0 (P0). No entanto, investigações mais detalhadas são necessárias para constatar se o aumento da espessura da bainha de mielina observado no presente estudo está relacionado a um aumento da síntese do RNAm de P0.

Cabe ressaltar ainda que a técnica de mobilização neural utilizada no presente estudo não é alongamento. Esta manobra neurodinâmica é, e foi realizada de modo oscilatório (BUTLER, 2000; SHACKLOCK, 2005). Alguns autores sugerem que estas manobras não devem ser realizadas em pacientes com evidência clínica de prejuízo na condução de impulsos nervosos (por não existir estudos experimentais específicos) (BUTLER, 2000; SHACKLOCK, 2005).

Em contrapartida, pesquisadores investigaram os efeitos durante 20 dias de alongamento gradual direto através de técnicas morfológicas. O diâmetro axonal e comprimento internodal foram consistentes com axônios em regeneração na parte distal. Assim, o estímulo com alongamento mecânico gradual do nervo ciático após transecção (uma lesão mais severa que o modelo adotado no presente estudo) induziu maior crescimento de axônios em regeneração (SAIJILAFU et al., 2008). Estes resultados supracitados corroboram com os achados no presente estudo, mostrando que terapias que induzem algum tipo de tensão mecânica sobre o nervo ciático, após lesão traumática, podem produzir efeito benéfico sobre o processo de regeneração do nervo.

Lesões traumáticas dos nervos causam significantes mudanças nas suas propriedades mecânicas. Um estudo com ratos vivos mostrou que após sete dias da lesão do nervo ciático, a tensão gerada no nervo apresenta aumento significativo com os componentes do teste EPE (flexão de quadril e dorsiflexão do tornozelo) e após 21 dias a tensão gerada com os mesmos movimentos assemelha-se aos valores encontrados em animais falso-operados (BOYD et al., 2005). As propriedades mecânicas mensuradas após a lesão podem refletir as alterações na produção e maturação do colágeno endoneural, como tem sido observado nas primeiras semanas após lesão por esmagamento do nervo ciático de ratos (ROYTTA et al., 1988).

Levando em consideração os dados obtidos no presente estudo, principalmente o grupo que recebeu tratamento precoce, sugere-se que neste momento da reorganização do colágeno endoneural o tratamento com mobilização neural é efetivo sendo um momento crucial na recuperação funcional. Contudo, a influência do tratamento sobre o colágeno endoneural não foi avaliada no estudo, sendo apenas uma especulação.

Além disso, é neste momento que ocorrem os eventos celulares importantes no processo inicial da degeneração Walleriana. Tais eventos celulares envolvidos na regeneração do nervo são dependentes de um bom suprimento sanguíneo na região lesionada. No entanto, com a reação fibrótica desencadeada, que é indicada pela quantidade de tecido conjuntivo encontrada no local da lesão (dados morfométricos do presente estudo), o processo de reabilitação pode ser prejudicado.

Quando a mobilização neural é realizada, sugere-se que com a tensão exercida sobre o nervo, o colágeno possa reorganizar-se no local da lesão, igualmente como ocorre no músculo, no qual as disposições (circunferenciais e longitudinais) das fibrilas de colágeno do endomísio estão relacionadas à elasticidade muscular. Além disso, a imobilidade leva a diminuição da elasticidade (BORG; CAULFIELD, 1980) e o tratamento pode assim também favorecer a angiogênese no local do esmagamento, restaurando a função sensório-motora do nervo. No entanto, a porcentagem da área de tecido conjuntivo do grupo MN1d no final do experimento não apresentou diferença significativa em relação ao grupo operado, talvez por essa medida não seja sensível à detecção da elasticidade endoneural. Estes eventos sugeridos acima só podem ser confirmados com futuras investigações.

Cleland e colaboradores (2006) descreveram algumas considerações fisiológicas para explicar os presentes achados. A mobilização neural pode ser efetiva na redução da dor neuropática por dispersar o edema intraneural, restaurando o gradiente de pressão, diminuindo a hipóxia e reduzindo os sintomas associados (COWELL; PHILLIPS, 2002).

Além disso, o tratamento com mobilização neural pode resultar em melhora por reduzir os impulsos antidrômicos gerados pelas fibras do tipo C, no local da lesão, que resultam na liberação de neuropeptídeos e inflamação subsequente no tecido inervado (SHACKLOCK, 1995).

É possível que a mobilização neural possa resultar na redução de cicatrizes teciduais, as quais aderem no tecido nervoso e em seus tecidos conjuntivos associados (TURL; GEORGE, 1998). Contudo, mais investigações são necessárias para detalhar qual ou quais destes efeitos estariam contribuindo para os mecanismos responsáveis pelos resultados encontrados no presente estudo.

É importante destacar que os nossos resultados são semelhantes aos achados em pesquisas envolvendo seres humanos a quais pacientes tratados com mobilização neural apresentaram melhora na capacidade motora, dor e centralização dos sintomas em relação a pacientes que não foram tratados (CLELAND et al., 2006).

Kitteringham (1996) examinou o possível efeito benéfico de exercícios auto-assistidos com extensão da perna estendida (EPE) em pacientes que sofreram descompressão lombar cirúrgica. Os exercícios com a EPE foram realizados por meio de um sistema posicionado a beira do leito. Os resultados, no entanto, foram inconclusivos pelas muitas variáveis encontradas no estudo.

Assim, os dados apresentados neste trabalho demonstraram que o grupo MN1d (tratamento precoce) exibiu melhora em todos os parâmetros funcionais avaliados e também em alguns parâmetros morfométricos quantitativos. Entretanto, os grupos que se iniciou o tratamento no 5º e 10º dia pós-esmagamento (tratamento tardio) não apresentaram melhora nos parâmetros funcionais relativos à função motora, mas melhoraram em relação à alodinia mecânica. Juntos, estes resultados demonstram que a mobilização neural tem efeito positivo na regeneração de nervos (ciáticos) periféricos lesionados. Ademais, a intervenção precoce do tratamento com a mobilização neural poderia ajudar na reabilitação de pacientes traumatizados e/ou que sofrem de dor neuropática periférica.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostra que a mobilização neural do nervo ciático iniciada precoce (a partir do 1º dia) e tardiamente (a partir do 5º e 10º dia), nas condições pré-estabelecidas neste estudo, foi capaz de influenciar positivamente o processo de recuperação morfofuncional do nervo ciático de ratos submetidos ao esmagamento, nos seguintes aspectos:

- A capacidade de recuperação funcional motora do nervo ciático dos ratos submetidos à mobilização neural realizada precocemente foi acelerada, como evidenciado pelo IFC e IEC. No entanto, nos grupos tratados tardiamente, não foram encontradas mudanças significativas.
- A capacidade de recuperação funcional sensorial do nervo ciático de ratos, a qual foi mensurada pela avaliação da alodinia, tanto no grupo de animais que receberam mobilização neural precocemente, quanto nos grupos animais tratados tardiamente, foi observada redução significativa na alodinia mecânica, mas não na alodinia ao frio.
- Os tratamentos com mobilização neural a partir do 1º e 5º dia influenciaram o processo de regeneração do nervo ciático, refletidos nos aumentos significativos da espessura da bainha de mielina e na densidade de fibras mielinizadas, observados nos respectivos grupos de tratamento. Porém, o tratamento realizado a partir do 10º dia não influenciou os parâmetros morfométricos avaliados. Nas demais mensurações nenhuma mudança foi observada.

Juntas, as conclusões apresentadas aqui mostram que a mobilização neural foi uma abordagem terapêutica efetiva no tratamento da lesão nervosa periférica do tipo axonotmese induzida em ratos e, além disso, quando realizada precocemente apresenta resultados mais expressivos na recuperação funcional do que quando realizada tardiamente.

REFERÊNCIAS

ABE, Y. et al. The limit of low speed peripheral nerve elongation neurological and circulatory aspects. **Journal of the Neurological Science**. v. 140, n. 1, p. 61-66. 1996.

ALI, Z. et al. Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and alpha-adrenergic sensitivity following L6 spinal nerve ligation in monkey. **Journal of Neurophysiology**. v. 81, n. 2, p. 455-466. 1999.

AL MOUTAERY, K. et al. Functional recovery and vitamin E level following sciatic nerve crush injury in normal and diabetic rats. **The International Journal of Neuroscience**. v. 96, n. 3, p. 245-254. 1998.

ASBURY, A.K.; FIELDS, H.L. Pain due to peripheral nerve damage: an hypothesis. **Neurology**. v. 34, n. 12, p. 1587-1590. 1984.

AZZE, R.J.; MATTAR JR., R. Lesões dos Nervos Periféricos. In: PARDINI JR., A.G. **Traumatismos da mão**. 3.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

BAIN, J.R. et al. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 83, n. 1, p. 129-136. 1989.

BEASLEY, A.W. The origin of orthopaedics. **Journal of the Royal Society of Medicine**. v. 75, n. 1. p. 648-655. 1982.

BEHSE, F. Morphometric studies on the human sural nerve. **Acta neurologica Svandinavica. Supplementum**. v. 132, p. 1-38. 1990.

BENEDETTI, F. et al. Dose-response relationship of opioids in nociceptive and neuropathic postoperative pain. **Pain**. v. 74, p. 205-211. 1998.

BERVAR, M. An alternative video footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. **Acta Chirurgiae Plasticae**. v. 44, n. 3, p. 86-89. 2002.

BERVAR, M. Video analysis of standing-an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 102, n. 2, p. 109-116. 2000.

BESTER, H. et al. Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 428, n. 1, p. 45-61. 2000.

BIRDER, L.A.; PERL, E.R. Expression of α_2 -adrenergic receptors in rat primary afferent neurones after peripheral nerve injury or inflammation. **The Journal of Physiology**. v. 515, n. 2, p. 533-542. 1999.

BORG, T.K.; CAULFIELD, J.B. Morphology of connective tissue in skeletal muscle. **Tissue Cell**. v. 12, n. 1, p. 197-207. 1980.

BORTOLANZA, L.B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 25, n. 2, p. 203-208. 2002.

BOVE, G.; LIGHT, A. The nervi nervorum: Missing link for neuropathic pain? **Pain Forum**. v. 6, n. 3, p. 181-190. 1997.

BOYD, B.S. et al. Strain and excursion in the rat sciatic nerve during a modified straight leg raise are altered after traumatic nerve injury. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 23, n. 4, p.764-770. 2005.

BREIG, A.; TROUP, J. D. G. Biomechanical considerations in the straight-leg-raising test. **Spine**. v. 4, n. 3, p. 242-250. 1979.

BRIDGE, P.M. et al. Nerve crush injuries—a model for axonotmesis. **Experimental Neurology**. v. 127, n. 2, p. 284-290. 1994.

BUTLER, D. **Mobilisation of the Nervous System**. Churchill Livingstone: Edinburgh. 1991.

BUTLER, D. **The Sensitive Nervous System**. Adelaide, Australia: Noigroup Publications. 2000.

CARGNIN-FERREIRA, E.; SARASQUETE, C. **Histofisiología de Moluscos Bivalvos Marinos**. Madrid: CSIC. 2008.

CHARNLEY, J. Orthopaedic sign in the diagnosis of disc protrusion. **Lancet**. v. 27, p. 186-192. 1951.

CHOI, Y. et al. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Pain**. v. 59, n. 3, p. 369-76. 1994.

CLELAND, J.A. et al. Slump stretching in the management of non-radicular low back pain: a pilot clinical trial. **Manual Therapy**. v. 11, n. 4, p. 279-286. 2006.

CORONEL, M.F. et al. Oligonucleotide IMT504 reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. **Neuroscience Letters**. v. 444, n. 1, p. 69-73. 2008.

COWELL, I.M.; PHILLIPS, D.R. Effectiveness of manipulative physiotherapy for the treatment of neurogenic pain syndrome: a single case study-experimental design. **Manual Therapy**. v. 7, n. 1, p. 31-38. 2002.

CROSBY, V. et al. The safety and efficacy of a single dose (500 mg or 1 g) of intravenous magnesium sulfate in neuropathic pain poorly responsive to strong opioid analgesics in patients with cancer. **Journal of Pain Symptom Management**. v. 19, n.1, p. 35-39. 2000.

DECOSTERD, I. et al. Progressive tactile hypersensitivity after a peripheral nerve crush: non-noxious mechanical stimulus-induced neuropathic pain. **Pain**. v. 100, n. 1, p. 155 -162. 2002.

DELLEMIJN, P. Are opioids effective in relieving neuropathic pain? **Pain**. v. 80, n. 3, p. 453-462. 1999.

DELLON, A.L.; MACKINNON, S.E. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. **Microsurgery**. v. 10, n. 3, p. 220-225. 1989.

DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 58, n. 1, p. 29-37.1995.

DE MEDINACELI, L. et al. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**. v. 77, n. 3, p. 634-643. 1982.

DEVOR, M. Response of nerves to injury in relation to neuropathic pain. In: MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.) **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. 5.ed. China: Elsevier, p. 905-927. 2006 a.

DEVOR, M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **The Journal of Pain** . v. 7, n. 1, S3-S12. 2006 b

DRAY, A.; BEVAN, S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 14, n. 8, p. 287-290. 1993.

DRISCOLL, P. et al. An in vivo study of peripheral nerves in continuity: biomechanical and physiological responses to elongation. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 20, n. 2, p. 370-375. 2002.

DYCK, P. Lumbar nerve root: the enigmatic eponyms. **Spine**. v. 9, n. 1, p. 3-5. 1984.

DWORNIK, M. et al. Principles of neuro mobilization for treating musculoskeletal disease. **Ortopedia, Traumatologia Rehabilitacja**. v. 9, n. 2, p. 111-121. 2007.

ELVEY, R.L. Treatment of arm pain associated with abnormal brachial plexus tension. **Australian Journal of Physiotherapy**. v. 32, n. 1, p. 225-230. 1986.

ENGLAND, J.D.; ASBURY, A.K. Peripheral neuropathy. **Lancet**, v. 26, n. 363, p. 2151-2161, 2004.

FLATTERS, S.J.; BENNETT, G.J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain**. v. 109, n. 1, p. 150-61. 2004.

GAMBLE, H.; EAMES, R. An electron microscope study of the connective tissues of human peripheral nerve. **Journal of Anatomy**. v. 98, p. 655- 663. 1964.

GUDEMEZ, E. et al. Dehydroepiandrosterone as an enhancer of functional recovery following crush injury to rat sciatic nerve. **Microsurgery**. v. 22, p. 234-241. 2002.

HAINES, D.E. **Neurociência fundamental: para aplicações básicas e clínicas** . 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2006.

HALL, T., QUINTNER, J. Responses to mechanical stimulation of the upper limb in painful cervical radiculopathy. **Australian Journal of Physiotherapy**. v. 42, n. 4, p. 277-285. 1996.

HARA, Y. et al. P0 mRNA expression increases during gradual nerve elongation in adult rats. **Experimental Neurology**. v. 184, n. 1, p. 428-435. 2003.

HARE, G.M.T. et al. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 89, n. 2, p. 251-258. 1992.

HOFFMAN, P.N., LASEK, J.R. Axonal transport of the cytoskeleton in regenerating motor neurons: constancy and change. **Brain Research**. v. 202, n. 2, p. 317-333. 1980.

HOKFELT, T. et al. Central consequences of peripheral nerve damage. In: MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. 5.ed. China: Elsevier, p. 947-959. 2006.

HROMADA, J. On the nerve supply of the connective tissue of some peripheral nervous system components. **Acta Anatomica**. v. 55, p. 343-351. 1963.

IKEDA, K. et al. Experimental study of peripheral nerve injury during gradual limb elongation. **Hand Surgery**. v. 5, n. 1, p. 41-47. 2000.

ILHA, J., et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabilitation and Neural Repair**. v. 22, n. 4, p. 355-66. 2008.

JAQUET, J.B. et al. Median, ulnar, and combined median–ulnar nerve injuries: functional outcome and return to productivity. **The Journal of Trauma**. v. 51, n. 4, p. 687-692. 2001.

JAWEED, M.M. et al. Effect of swimming on compensatory hypertrophy of reinnervating soleus and plantaris muscle. **American Journal of Physical Medicine**. v. 53, n. 1, p. 35-40. 1974.

KANAYA, F. et al. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 98, n. 7, p. 1264-1271. 1996.

KITTERINGHAM, C. The effect of straight leg raise exercises after lumbar decompression surgery - a pilot study. **Physiotherapy**. v. 82, p. 115-123. 1996.

KIERNAN, J.A. **Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice**. London. Oxford: Butterworth-Heinemann. 2004.

- KULICH, S.D. et al. The tissue origin of low back pain and sciatica: a report of pain responses to tissue stimulation during operations on the lumbar spine using local anaesthesia. **Orthopaedic Clinics of North America**. v. 22, n. 2, p. 181-187. 1991.
- LIU, C.N. et al. Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. **Pain**. v. 85, n. 3, p. 503-521. 2000.
- LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**. v. 137, n. 3, p. 473-477. 2008.
- LUNDBORG, G.; DAHLIN, L. The pathophysiology of nerve compression. **Hand Clinics**. v. 8, n. 2, p. 215-227. 1992.
- MACKINNON, S.E. et al. Histologic assessment of the nerve regeneration in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 75, n. 3, p. 384-388. 1985.
- MACKINNON, S.E. Surgical management of the peripheral nerve gap. **Clinics in Plastic Surgery**. v. 16, n. 3, p. 587-603. 1989.
- MACKINNON, S.E. et al. An assessment of the effects of internal neurolysis on a chronically compressed rat sciatic nerve. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 81, n.2, p .251-258. 1988.
- MA, C. et al. Similar electrophysiological changes in axotomized and neighboring intact dorsal root ganglion neurons. **Journal of Neurophysiology**. v. 89, n. 3, p. 1588-1602. 2003.
- MATSUURA, T. et al. Effect of weight bearing on recovery from nerve injury in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**. v. 91, n. 5, p. 2334-2341. 2001.
- MA, W.; BISBY, M.A. Partial and complete sciatic nerve injuries induce similar increases of neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide immunoreactivities in primary sensory neurons and their central projections. **Neuroscience**. v. 86, n. 4, p.1217-1234. 1998.
- MEEK, M.F. et al. Biodegradable p(DLLA-epsilon-CL) nerve guides versus autologous nerve grafts: electromyographic and video analysis. **Muscle and Nerve**. v. 24, n. 6, p.753-759. 2001.
- MILLES, H. et al. Mechanical properties of peripheral nerves. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 314, p. 76-83. 1995.

MUELLER, M.; MALUF, K. Tissue adaptation to physical stress: a proposed “physical stress theory” to guide physical therapist practice, education, and research. **Physical Therapy**. v. 82, n. 4, p. 383-403. 2002.

NAIK, A.K. et al. GABA(A) receptor modulation in dorsal root ganglia in vivo affects chronic pain after nerve injury. **Neuroscience**. v. 154, n. 4, p. 1539-1553. 2008.

NAVARRO X. et al. A. **Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration**. Progress in Neurobiology. v. 82, n. 4, p. 163-201. 2007.

NOGUCHI, K. Pain and neuroplastic changes in the dorsal root ganglia. In: FLOR, H. et al. **Proceedings of the 11th World Congress on Pain**. Seattle: IASP, p. 93-108. 2006.

OBATA, K. et al. Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Pain**. v. 101, n. 1, p. 65-77. 2003.

OGARD, W. K.; STOCKER T.B.W. Neuropatias Periféricas. In: UMPHRED, D.A. **Fisioterapia Neurológica**. 2.ed. São Paulo: Manole. p. 331-344. 1994.

OLIVEIRA, E.F. et al. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. **Journal of Reconstructive Microsurgery**. v. 17, n. 1, p. 69-75. 2001.

PITCHER, G.M., HENRY, J.L. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. **Experimental Neurology**. v. 186, n. 2, p. 173-197. 2004.

PITCHER, G.M. et al. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 87, n. 2, p. 185-193. 1999.

POWELL, H.C.; MYERS, R.R. Pathology of experimental nerve compression. **Laboratory Investigation**. v. 55, n. 1, p. 91-100. 1986.

RASO, V. V. M. **Os efeitos do ultra-som terapêutico no tratamento das lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos**. 2002. 59 p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2002.

RASO, V.V.M. et al. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? **Journal of Neuroscience Methods**. v. 142, n. 2, p. 185-192. 2005.

RECHTHAND, E.; RAPOPORT, S. Regulation of the microenvironment of peripheral nerve: role of the blood-nerve barrier. **Progress in Neurobiology**. v. 28, n. 4, p. 303-343. 1987.

REID, J. Effects of flexion-extension movements of the head and spine upon the spinal cord and nerve roots. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**. v. 23, n.1, p. 214-221. 1960.

REINECKE, K. et al. Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. **The FASEB Journal**. v. 17, n. 14, p. 2094-2096. 2003.

REMPEL, D. et al. Pathophysiology of nerve compression syndromes: response of peripheral nerves to loading. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 81, n. 11, p.1600-1610. 1999.

RODRIGUEZ, F.J. et al. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. **Drug Discovery Today Disease Models**. v. 1, n. 1, p. 177-185. 2004.

ROSBERG, H.E. et al. Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function, and general health. **Scandinavian Journal of Plastic Reconstruction Surgery and Hand Surgery**. v.39, n. 6, p. 360-369. 2005.

ROYTTA, M. et al. Schwann cells and collagen synthesis in taxol-treated nerve crush. An electron microscopic study. **Collagen and Related Research**. v. 8, n. 2, p.123-131. 1988.

RUOCCO, I. et al. Peripheral nerve injury leads to the establishment of a novel pattern of sympathetic fibre innervation in the rat skin. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 422, n. 2, p. 287-296. 2000.

RYDEVIK, B. et al. An in vitro mechanical and histological study of acute stretching on rabbit tibial nerve. **Journal of Orthopaedic Research**. v.8, n.5, p.694 -701. 1990.

SAIJILAFU, et al. Gradual stretching of the proximal nerve stump induces the growth of regenerating sprouts in rats. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 26, n. 7, p. 1012-1017. 2008.

SALONEN, V. et al. Quantitation of Schwann cells and endoneurial fibroblast-like cells after experimental nerve trauma. **Acta Neuropathologica**. v. 75, n. 4, p. 331-336. 1988.

SCHIFF, R.; ROSENBLUTH, J. Ultrastructural localization of laminin in rat sensory ganglia. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v. 34, n. 12, p. 1691–1699. 1986.

SCHMIDT, R.F. et al. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **The Journal of Neuroscience**. v. 15, n. 1, p. 333-341. 1995.

SEDDON, H. War injuries of peripheral nerves. **British Journal of Surgery**. v. 2, p.235. 1942.

SEDDON, H. Three types of nerve injury. **Brain**. v. 66, p. 237-288. 1943.

SELTZER, Z., et al. The role of injury discharge in the induction of neuropathic pain behavior in rats. **Pain**. v. 46, n. 3. p. 327-336. 1991.

SHACKLOCK, M. Neurodynamics. **Physiotherapy**. v. 81, p. 9 -16. 1995.

SHACKLOCK, M.O. Positive upper limb tension test in a case of surgically proven neuropathy: analysis and validity. **Manual Therapy**. v. 1, n. 3, p. 154-161. 1996.

SHACKLOCK, M. **Clinical Neurodynamics**: a new system of musculoskeletal treatment. Oxford: Elsevier. 2005.

SHANTHAVEERAPPA, T.; BOURNE, G. The “perineural epithelium,” a metabolically active, continuous, protoplasmic cell barrier surrounding peripheral nerve fasciculi. **Journal of Anatomy**. v. 96, p. 527-537. 1962.

SHEN, N.; ZHU, J. Application of sciatic functional index in nerve functional assessment. **Microsurgery**. v. 16, n. 8, p. 552-555. 1995.

SLUKA, K.A.; WRIGHT, A. Knee joint mobilization reduces secondary mechanical hyperalgesia induced by capsaicin injection into the ankle joint. **European Journal of Pain**. v. 5, n. 1, p. 81-87. 2001.

STOLINSKI, C. Structure and composition of the outer connective tissue sheaths of peripheral nerve. **Journal of Anatomy**. v. 186, n. 1, p.123–130. 1995.

SUNDERLAND, S.; BRADLEY, K. The cross-sectional area of peripheral nerve trunks devoted to nerve fibres. **Brain**. v. 72, n. 3, p. 428-449. 1949.

SUNDERLAND, S. The anatomy and physiology of nerve injury. **Muscle Nerve**. v. 13, n. 9, p. 771-784. 1990.

SUNDERLAND, S. The connective tissues of peripheral nerves. **Brain**. v. 88, n. 4, p. 841-854. 1965.

SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain**. v. 74, n. 4, p. 491-516. 1951.

TANAKA, K. et al. Myelinated fiber regeneration after sciatic nerve crush: morphometric observations in young adult and aging mice and effects of macrophage suppression and conditioning lesions. **Experimental Neurology**. v. 118, n. 1, p. 53-61. 1992.

THOMAS, P.K. et al. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. In: Dyck, P.J., Thomas, P.K. **Peripheral Neuropathy**. 3. ed. v. 1. Philadelphia: WB Saunders. p. 28-91. 1993.

THOMAS, P.K. The cellular response to nerve injury. 3. The effect of repeated crush injuries. **Journal of Anatomy**. v. 106, n. 3, p. 463-70. 1970.

THOMAS, P.K. The connective tissue of peripheral nerve: an electron microscope study. **Journal of Anatomy**. v. 97, p. 35- 44. 1963.

TOFARIS, G.K. et al. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **The Journal of Neuroscience**. v. 22, n. 15, p.6696–6703. 2002.

TOPP, K.S.; BOYD, B.S. Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. **Physical Therapy**. v. 86, n. 1, p. 92-109. 2006.

TRACEY, D.J.; WALKER, J.S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflammation Research**. v. 44, n. 10, p. 407-411. 1995.

TURL, S.E.; GEORGE, K.P. Adverse neural tension: a factor in repetitive hamstring strain? **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**. v. 27, n.1, p.16-21. 1998.

VAREJÃO, A.S.P. et al. Functional assessment of peripheral nerve recovery in the rat: gait kinematics. **Microsurgery**. v. 21, n. 8, p. 383-388. 2001 a.

VAREJÃO, A.S. et al. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. **Journal of Neurotrauma**. v. 21, n. 11, p.1652-1670. 2004a.

VAREJÃO, A.S.P. et al. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. **Journal of Neuroscience Methods** . v. 108, n. 1, p. 1-9. 2001b.

VAREJÃO, A.S.P. et al. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. **Neurological Research**. v. 26, n. 2, p. 186-194. 2004b.

VERDÚ, E., NAVARRO, X. Comparison of immunohistochemical and functional reinnervation of skin and muscle after peripheral nerve injury. **Experimental Neurology**. v. 146, n. 1, p. 187-198. 1997.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16, n. 2, p. 109-110. 1983.

WALKER, J.L. et al. Gait-stance duration as measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 52, n. 1, p. 47-52. 1994 a.

WALKER, J.L. et al. Improved footprint analysis using video recording to assess functional recovery following injury to the rat sciatic nerve. **Restorative Neurology and Neuroscience**. v. 6, p. 189-193. 1994 b.

WALL, P.D., DEVOR, M. Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in nerve and injured rats. **Pain**. v. 17, n. 4, p. 321-339.1983.

WALL, P.D., GUTNICK, M. Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma. **Nature**. v. 248, p. 740-743. 1974.

WAXMAN, S.G. et al. Sodium channels and pain. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 96, n. 14, p. 7635-7639. 1999.

WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. The development of locomotion in the rat. **Development Brain Research**. v.57, p. 163-174.1990.

WOOLF, C.J. et al. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. **The Journal of Comparative Neurology**. v.360, n. 1, p. 121-134. 1995.

WRIGHT, T.W. et al. Excursion and strain of the median nerve. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 78, n. 12, p. 1897-1903. 1996.

WRIGHT, T.W. et al. Ulnar nerve excursion and strain at the elbow and wrist associated with upper extremity motion. **The Journal of Hand Surgery**. v. 26, n. 4, p. 655-662. 2001.

WU, G. et al. Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. **The Journal of Neuroscience**. v. 22, n. 17. p. 7746-7753. 2002.