



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ESPECÍFICO NA
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DA LOCOMOÇÃO E
REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA APÓS LESÃO
TRAUMÁTICA EXPERIMENTAL DO NERVO CIÁTICO EM
RATOS ADULTOS**

Dissertação de Mestrado

Jocemar Ilha

Porto Alegre
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ESPECÍFICO NA RECUPERAÇÃO
FUNCIONAL DA LOCOMOÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA
PERIFÉRICA APÓS LESÃO TRAUMÁTICA EXPERIMENTAL DO
NERVO CIÁTICO EM RATOS ADULTOS**

Jocemar Ilha

Orientadora
Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre
2007

AGRADECIMENTOS

- À Professora Matilde, pelo carinho com que me acolheu em seu laboratório, pela confiança e orientação, mas acima de tudo pela grande amizade;
- À Carmen Silvia, pelo grande incentivo desde a minha graduação e por ser uma grande amiga;
- Aos professores e funcionários do PPG-Neurociências, pela transmissão de conhecimento e o auxílio durante o mestrado;
- A todos os colegas e amigos que fiz no Laboratório de Histofisiologia comparada, em especial à Rafaela, à Taís, à Simone e ao Tarta, pelo auxílio com as técnicas, pelos momentos de descontração e pelo companheirismo nos momentos de angústia;
- Ao Tiago, pelo incentivo, carinho e apoio incondicional enquanto buscava a realização de meu sonho;
- Às minhas grandes amigas Patty e Ig, pela sincera amizade, pelos momentos de risos, pelo ombro e pela hospedagem nos momentos que mais precisei;
- À Lucy por ter dividido comigo a angústia da seleção e os dias de estudo para a prova, pela coragem de encarar uma incerteza na busca de um sonho;
- Ao Edu e à Lígia, pela convivência e amizade;
- Aos meus queridos pais, pelo incentivo e apoio em minhas escolhas.
- À UFRGS por oportunizar a realização deste trabalho.
- À CAPES, pela bolsa concedida durante meu período de estudo.

Obrigado!

“Menor que meu sonho, não posso ser”

Lindolf Bell

RESUMO

Os exercícios físicos têm sido empregados em estudos clínicos experimentais com o propósito de estimular a regeneração nervosa periférica, entretanto estas pesquisas não examinam os efeitos de tipos específicos de exercícios sobre a regeneração das fibras nervosas periféricas. Neste estudo, testamos os possíveis efeitos de um programa de treinamento aeróbico, de resistência muscular e a combinação de ambos os programas (durante 5 semanas) na regeneração do nervo ciático em ratos após lesão nervosa por compressão, utilizando análises funcional e morfométrica. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o treinamento aeróbico melhora a recuperação funcional, desde a primeira semana de treino, e a diferenciação morfológica do nervo ciático em regeneração após 5 semanas de treinamento quando comparado com os animais lesionados sedentários. Por outro lado, o treinamento de resistência muscular e a combinação dos treinos aeróbico e de resistência, ou seja, treinamento concorrente, retardam a recuperação funcional, embora não a impeçam. Além disso, 5 semanas de treinamento de resistência muscular e concorrente não melhoram a diferenciação morfológica do nervo ciático em regeneração quando comparado com os animais do treinamento aeróbico. Neste estudo, a diferenciação dos nervos em regeneração dos ratos que realizaram treinamento de resistência muscular e concorrente foi similar à dos animais lesionados sedentários. Estes dados provêm evidências de que o treinamento aeróbico tem um grande potencial para promover a recuperação funcional e melhorar a diferenciação do nervo ciático em regeneração após lesões traumáticas experimentais, e que os treinamentos de resistência muscular e concorrente parecem retardar a recuperação funcional e não interferir na diferenciação das fibras nervosas em regeneração do nervo ciático lesionado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Locomoção nos vertebrados	3
1.2 Estrutura normal dos nervos periféricos.....	5
1.3 Lesões dos nervos periféricos.....	8
1.4 Exercício físico e neuropatias periféricas.....	12
2 HIPÓTESE DE TRABALHO	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 MÉTODOS E RESULTADOS.....	17
4.1 Artigo - Jocemar Ilha, Rafaela T. Araujo, Tais Malysz, Erica E.S. Hermel; Paula Rigon, Léder L. Xavier, Matilde Achaval. Endurance and resistance exercise training elicits specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats.	17
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	52
6 APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF.....	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
ChE	Colinesterase
DNM	Doença neuromuscular
GPC.....	Gerador de padrão central
N-CAM	Molécula neural de adesão celular
NGF.....	Fator de crescimento neural
NP	Nervo periférico
NPs.....	Nervos periféricos
SNC.....	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SNV.....	Sistema nervoso vegetativo
TrK.....	Receptor tirosino-quinase

ARTIGO

BDNF.....	Brain-derived neurotrophic factor
BV	Blood vessel
ChE	Cholinesterase
D.....	Distal
Dd.....	Degeneration debris

E	Experimental
IBRO	International Brain Research Organization
IGF	Insulin-like growth factor
ITS.....	Intermediary toe spread
LSD	Least significant differences
MAG	Myelin associated glycoprotein
MET	Maximal exercise test
Mf.....	Myelinated nerve fiber
MN	Motoneuron
N.....	Normal
NMDs.....	Neuromuscular diseases
NMJ.....	Neuromuscular junction
NS	Nervous system
NT	Neurotrophin
P	Proximal
PB.....	Phosphate buffer
PN	Peripheral nerve
PNs.....	Peripheral nerves
PL.....	Print length
Sc.....	Schwann cell
SEM	Standard error of the mean
SFI.....	Sciatic functional index
TS.....	Toe spread
TrK.....	Tyrosine kinase receptors
Uf	Unmyelinated nerve fiber

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática das relações dentro de diversas regiões que integram o sistema sensório-motor envolvido na locomoção.....4
- Figura 2. Desenho representativo das fibras nervosas mielínicas do SNP.....6
- Figura 3. Corte transversal de um nervo periférico.....7
- Figura 4. Figura esquemática mostrando resumidamente o processo de degeneração walleriana no SNP9

ARTIGO

- Figure 1. Comparison of the functional recovery determined by sciatic functional index (SFI) before (pre-training) and after (post-training) 1, 2, 3 and 4 weeks of specific exercise physical training calculated from the free walking pattern of the sciatic nerve crushed rats48
- Figure 2. Photomicrographs of cross-semithin sections (1 μ m) obtained from regenerating sciatic nerves after 5 weeks of specific exercise training.....49

Figure 3. Effects of specific physical exercise training on the morphometric parameters of regenerating right sciatic nerve fibers 50

Figure 4. Effects of specific physical exercise training on morphometric parameters of regenerating right sciatic nerves 51

1 INTRODUÇÃO

Em contraste ao sistema nervoso central (SNC), lesões axonais no sistema nervoso periférico (SNP) freqüentemente resultam em um maior grau de regeneração espontânea. Esta capacidade de regeneração é determinada principalmente pela presença de um ambiente permissivo ao crescimento axonal. O conhecimento de que as células de Schwann são capazes de permitir e dar suporte a regeneração axonal no SNP, contrastando com a incapacidade demonstrada pelos oligodendrócitos no SNC, tem gerado a falsa noção de que nervos periféricos (NPs) lesionados regeneram e reinervam funcionalmente seus alvos com facilidade. Entretanto, é clinicamente reconhecido que a recuperação funcional de pacientes após lesões dos NPs é freqüentemente incompleta ou até mesmo ausente (Gordon et al., 2003).

Esta falha no processo de regeneração axonal deve-se a existência de uma “janela temporal” para a regeneração axonal, a qual é relativamente curta para que os neurônios lesionados regenerem seus axônios e as células de Schwann proporcionem esta regeneração por longas distâncias. Os principais fatores que contribuem para a redução da capacidade regenerativa nos NPs e, conseqüentemente, uma pobre recuperação funcional com o tempo após a lesão são (a) o progressivo declínio na habilidade dos motoneurônios de promover o crescimento axonal e (b) a atrofia e conseqüente falha das células de Schwann, cronicamente desprovidas do contato com o axônio, em prover um ambiente favorável ao crescimento axonal (Gordon et al., 2003).

Em humanos a distância sobre a qual os axônios devem regenerar após uma lesão periférica são longas e a taxa de crescimento é de aproximadamente 1 mm/dia

ocasionando um retardo na reinervação que pode resultar na atrofia do tubo endoneural e degeneração dos músculos desnervados com uma significativa perda funcional (Tonge; Golding, 1993).

A busca por estratégias que possibilitem acelerar a regeneração têm sido uma intrigante busca das neurociências. Neste contexto, muitos modelos experimentais têm sido usados para proporcionar maior conhecimento sobre a regeneração nervosa e desenvolvimento de terapias que promovam uma adequada recuperação funcional. A utilização do nervo ciático de ratos como modelo de estudo da regeneração nervosa é uma das mais empregadas (Rodríguez et al., 2004).

Embora os roedores apresentem uma taxa de regeneração axonal de 3 - 4 mm por dia, e a distância a ser regenerada seja menor que a do homem (Tonge; Golding, 1993), o que possibilita uma rápida reinervação das estruturas alvos, este modelo fornece importantes informações sobre o processo de diferenciação celular das fibras em regeneração e da recuperação funcional, proporcionando o aprimoramento de técnicas que permitam acelerar a regeneração neural. Além disso, o nervo ciático de ratos prove uma fonte de estudo do tecido nervoso periférico de mamíferos que demonstra detalhes celulares indistinguíveis dos nervos humanos (Mackinnon et al., 1985) e ainda, constitui um tronco nervoso com adequado comprimento na porção média da coxa, possibilitando manipulações cirúrgicas e a fácil realização de lesões experimentais (Rodríguez et al., 2004).

As lesões traumáticas experimentais do nervo ciático de ratos causam severos déficits na função motora do membro posterior ipsilateral à lesão nervosa e uma sobrecarga funcional no membro contralateral, determinando um padrão locomotor alterado, o qual impede a correta execução da locomoção (De Medinaceli et al., 1982; Bridge et al., 1994; De Medinaceli, 1995; Ilha et al., 2006).

Estudos clínicos experimentais, utilizando este modelo, têm empregado o exercício físico como estratégia para estimular a regeneração nervosa e promover recuperação funcional da locomoção, entretanto resultados conflitantes têm sido obtidos, o que remete a importância de novas pesquisas dentro deste campo das neurociências (Van Meeteren et al., 1997).

1.1 Locomoção nos vertebrados

De maneira geral, a locomoção é uma função motora que por meio da produção de movimentos coordenados e rítmicos assegura o deslocamento ativo de um organismo no ambiente. Muitas vezes, este deslocamento locomotor está implicado com comportamentos fundamentais e necessários a sobrevivência, tais como busca por alimento, reprodução, fuga, etc.

Nos vertebrados, o modo como o ato locomotor ocorre é prioritariamente determinado pela arquitetura esquelética sobre a qual os músculos vão exercer suas forças através das inserções de seus tendões (Bioulac et al., 2004). Durante a locomoção, o SNC é capaz de coordenar quais articulações irão mover-se, a que distância e durante quanto tempo o movimento ocorrerá (Duysens; Van de Crommert, 1998). Este comportamento motor é controlado por mecanismos espinhais e supra-espinhais que recebem entradas sensoriais e geram comandos motores (Fig. 1) (Armstrong, 1988; Duysens; Van de Crommert, 1998; Bioulac et al., 2004).

O programa de comando locomotor é feito por circuitos neuronais locais na medula espinal, conhecidos como geradores de padrão central (GPCs) para locomoção (Grillner, 1985; Duysens; Van de Crommert, 1998; Bioulac et al., 2004). Dentro da medula espinal, estes circuitos de interneurônios são capazes de ativar motoneurônios em uma seqüência apropriada, controlando a sincronização temporal e a coordenação de movimentos

complexos, bem como excitar outros tipos de interneurônios envolvidos na transmissão de informações das vias descendentes e dos aferentes sensoriais, possibilitando ajustes, através destas vias, durante as várias fases do ciclo locomotor. Este modelo é proporcionalmente complexo e envolve a ativação bilateral seqüencial de músculos que agem em diferentes articulações, cada uma tendo seu próprio sinal característico de amplitude e velocidade (Grillner, 1985; Grillner; Wallén, 2002; Tresch et al., 2002; Dietz, 2003).

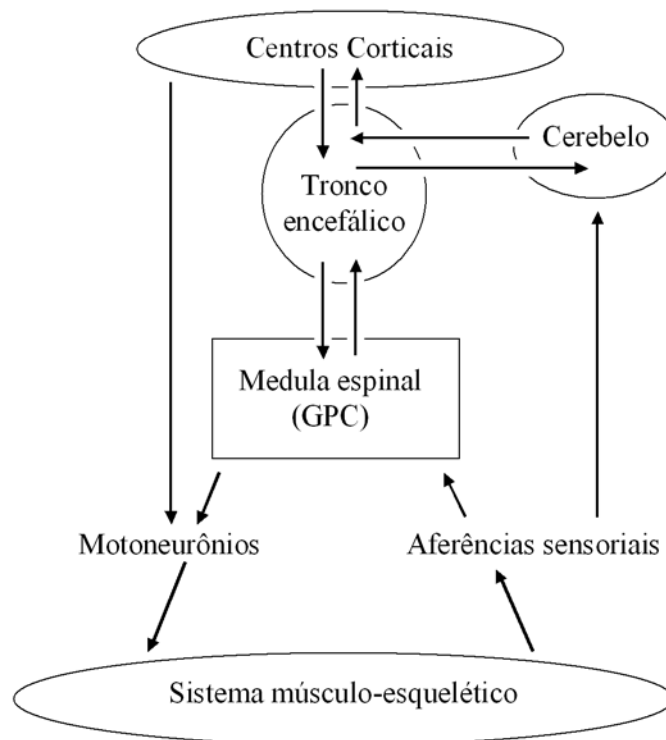


Figura 1. Representação esquemática das relações dentro de diversas regiões que integram o sistema sensório-motor envolvido na locomoção (modificado de Gasc, 2001).

Entretanto, a locomoção somente pode ser apropriadamente realizada se um conjunto de exigências biomecânicas for recrutado por um padrão de sinais elétricos enviado através dos nervos periféricos para ativar conjuntos específicos de músculos (Duyssens; Van

de Crommert, 1998). Os motoneurônios, considerados a via final comum do movimento, são os responsáveis por transmitir o comando motor gerado pelo SNC aos efetores musculares (Bioulac et al., 2004). Desta forma, as atividades motoras, como a locomoção, necessitam, além da integridade dos centros geradores e moduladores da atividade motora em diversos níveis do SNC, um SNP intacto. Além disso, não somente a ativação e coordenação normal dos músculos esqueléticos dependem da integridade dos motoneurônios α pelos quais são inervados, mas são também dependentes das informações sensoriais transmitidas dos músculos e tecidos adjacentes ao SNC pelos neurônios aferentes (Fredericks, 1996).

1.2 Estrutura normal dos nervos periféricos

Os NPs fazem do SNP, o qual de uma maneira geral engloba os axônios dos neurônios motores e os neurônios sensoriais, que constituem os nervos espinais e cranianos, os plexos e os troncos nervosos periféricos até as suas ramificações terminais intramusculares, bem como o sistema nervoso vegetativo (SNV) (Vallat; Magy, 2005).

Cada NP, independentemente de ter origem espinal ou cranial, é composto de fibras nervosas, camadas de tecido conjuntivo fibroso e vasos sangüíneos (Fredericks, 1996; Thomas et al., 1997). As fibras nervosas incluem neurônios motores somáticos (α e γ), fibras aferentes somáticas dos músculos, pele e articulações, além de fibras do sistema neurovegetativo. Desta forma, um NP contém tanto fibras nervosas mielínicas como amielínicas. Os axônios das fibras mielínicas são cobertos pela bainha de mielina formada por muitas camadas compactas da membrana plasmática das células de Schwann, interrompida somente nas regiões entre uma célula de Schwann e outra, nos nodos de Ranvier (fig. 2). A função normal dessas fibras depende da integridade da bainha de mielina, a qual isola e protege o axônio, além de aumentar a velocidade de condução dos impulsos nervosos. As

fibras motoras somáticas e proprioceptivas são as fibras mielínicas de maior diâmetro, enquanto que as fibras sensoriais que mediam a dor são as menores (Fredericks, 1996).

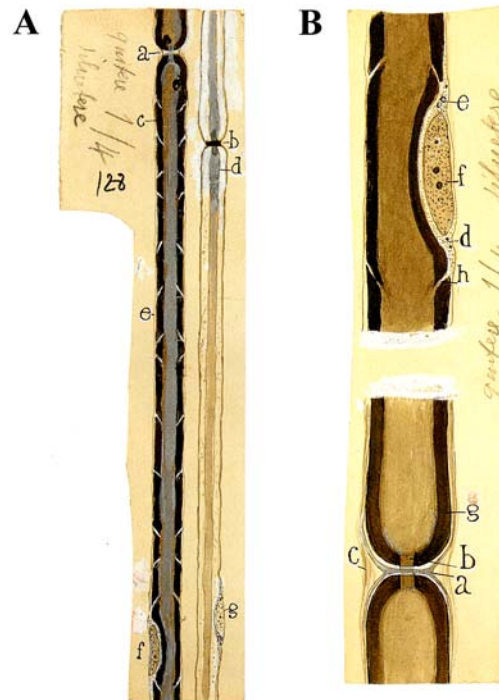


Figura 2. Desenho representativo das fibras nervosas mielínicas do SNP. (A) a, tubo de tecido conjuntivo; b, nodo de Ranvier; c, bainha de mielina; d, axônio; e, região internodal; e – f, núcleo da célula de Schwann. (B) a, nodo de Ranvier; b, região paranodal; c, tubo de tecido conjuntivo; d – e, citoplasma da célula de Schwann; f, núcleo da célula de Schwann; g, bainha de mielina; h, incisura de Lantermann (modificado de Ramón Y Cajal, 2003).

As fibras amielínicas são envolvidas pelas células de Schwann, porém sem formar a mielina. Estas pequenas fibras estão dispersas entre as fibras mielínicas e incluem as fibras do SNV e sensoriais que mediam a dor e temperatura. A proporção de fibras amielínicas para mielínicas em um tronco nervoso periférico varia com a função do nervo, mas na maioria destes, aproximadamente 75% das fibras são amielínicas (Fredericks, 1996).

As fibras nervosas nos NP são envoltas por sucessivas camadas de tecido conjuntivo, o qual serve para proteger e sustentá-las. Fibras individuais são rodeadas por fibras colágenas e fibrócitos, constituindo o endoneuro (Fredericks, 1996; Fletcher, 1998).

Este prove suporte para as fibras e as guia durante o processo de regeneração (Fredericks, 1996). Grupos de fibras formam feixes chamados de fascículos, cada um destes, no entanto, é rodeado por uma forte bainha de tecido conjuntivo fibroso com grande quantidade de fibras colágenas, o perineuro (Fredericks, 1996; Fletcher, 1998). Esta bainha prove uma grande força mecânica, e ainda serve como uma barreira de difusão perivascular. O perineuro isola quimicamente os feixes de fibras, preservando um ambiente fluído no interior dos fascículos, muito similar à proteção exercida pela barreira hemato-encefálica no SNC. O perineuro atua como uma barreira para macromoléculas, podendo proteger as fibras nervosas de várias substâncias danosas, como certas toxinas, antígenos e vírus (Fredericks, 1996). Feixes de fascículos são ainda rodeados por uma camada de tecido conjuntivo mais externa, chamada de epineuro (fig. 3).

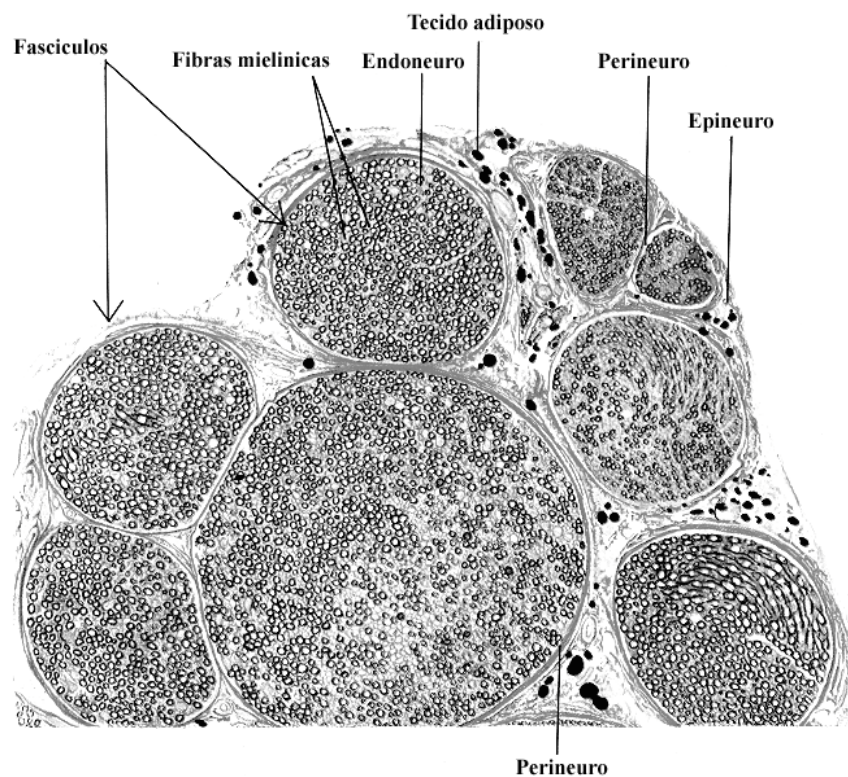


Figura 3. Corte transversal de um nervo periférico (modificado de Williams, 1995).

O epineuro é a camada tecido conjuntivo mais externa e caracteriza-se por ser um pouco mais frouxa do que o perineuro. Esta camada serve como um amortecedor durante os movimentos do nervo, protegendo os fascículos de traumas externos, além de manter o suprimento de oxigênio através dos vasos epineurais. Além disso, a força de tensão e a elasticidade dos NPs reside predominantemente no tecido conjuntivo do epineuro. A quantidade de epineuro varia entre os nervos e em diferentes locais ao longo do mesmo nervo, dependendo das forças de atrito que agem sobre estas regiões (Fletcher, 1998).

1.3 Lesões dos nervos periféricos

A neuropatia periférica é uma doença neuromuscular (DNM) comum que, de uma maneira geral, indica alguma desordem do SNP (England; Asbury, 2004; Vallat; Magy, 2005). Existem numerosas condições patológicas que adversamente afetam os NPs, causando severas deficiências sensório-motoras e desabilidades funcionais (Vallat; Magy, 2005). As desordens mais comuns dos NPs são aquelas que afetam primariamente o axônio, chamadas axonopatias. Estas são freqüentemente causadas por traumas agudos, podendo ocorrer esmagamento por compressão, por contusões traumáticas, ou secção por artefatos penetrantes (Fredericks, 1996). Estima-se que a prevalência das neuropatias periféricas seja de aproximadamente 2.400 a cada 100.000 pessoas (2,4 % da população mundial), e que entre as pessoas com mais de 55 anos esta prevalência alcance 8% desta população (England e Asbury, 2004; Martyn; Hughes, 1997).

Após a injúria nervosa periférica, a axotomia das fibras nervosas determina uma série de reações induzidas pela lesão axonal (reação axonal) que começam a ocorrer nos neurônios sensoriais e motores, principalmente no soma celular, no local e distalmente à lesão (Fig. 4). O processo que ocorre no soma neuronal é chamado cromatólise e tem início dentro

das primeiras horas após a axotomia. Ao nível óptico, este processo exibe uma vacuolação do citoplasma, aumento do volume nuclear, formação de múltiplos nucléolos e um deslocamento do núcleo para uma posição excêntrica ou periférica, acompanhada pelo edema do soma neuronal (Grafstein, 1975; Reier, 1995; Kartje, 2006). No entanto, a mais marcante característica da cromatólise é a dissolução do material de Nissl, demonstrado pela reduzida coloração citoplasmática e granularidade quando secções do tecido são coradas com corantes básicos. Ao nível ultraestrutural, o correlato mais marcante é o rompimento do aparelho de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso, com um concomitante aumento na densidade de poliribosomas livres no citoplasma (Reier, 1995).

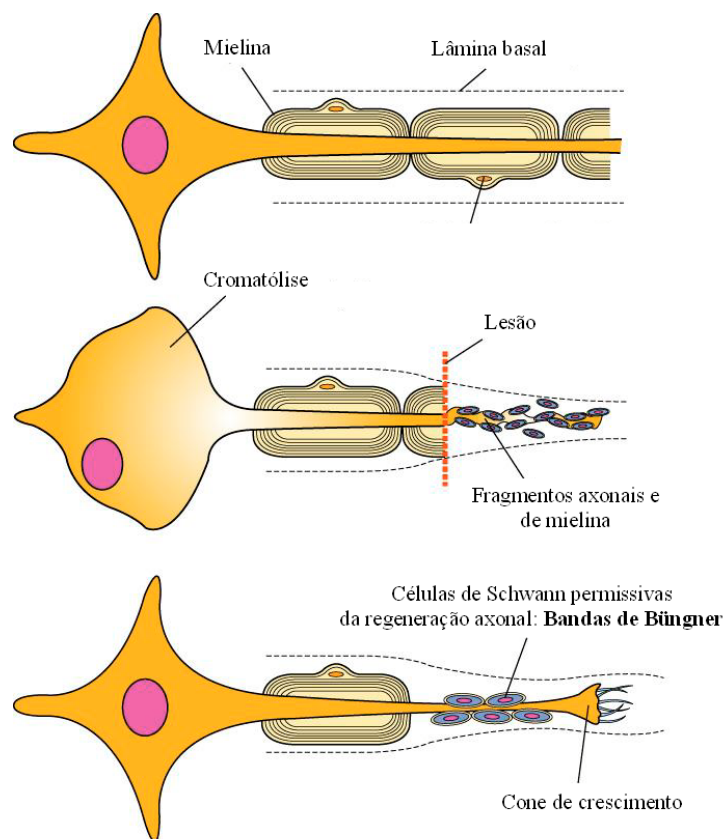


Figura 4. Figura esquemática mostrando resumidamente o processo de degeneração walleriana no SNP. Após uma lesão axonal, o corpo neuronal inicia um processo chamado de cromatólise, caracterizado pelo aumento de volume (edema) e posição excêntrica do núcleo. Tão logo a lesão ocorra, o axônio e a mielina localizados distalmente ao corpo neuronal degeneram. Células de Schwann permissivas ao crescimento secretam fatores que estimulam os axônios a sobreviver e regenerar (modificado de Kartje, 2006).

O axônio desconectado do soma neuronal pela injúria tem seu segmento distal gradualmente degenerado, este processo foi primeiramente descrito em 1850 nos nervos periféricos de rãs pelo fisiologista britânico Augusto Waller e foi subsequentemente chamado de degeneração walleriana. Os principais alvos celulares da degeneração walleriana são o axônio, as células de Schwann e a bainha de mielina por elas formada, bem como os macrófagos (Schröder, 1975; Ide, 1996; Dahlin; Brandt, 2004).

Logo após a lesão axonal, ambos os segmentos proximal e distal do axônio retraem-se, o axoplama extravasa e as membranas lesadas colapsam. A porção distal do axônio degenera, a bainha de mielina se rompe e os fragmentos de mielina são fagocitados pelas células de Schwann e por macrófagos hematógenos que se infiltram na local da lesão e no segmento distal do axônio lesionado. As células de Schwann, desprovidas do contato com os axônios, se desdiferenciam, proliferam e alinham-se na forma de um cordão de células, chamado de coluna de células de Schwann ou bandas de Büngner, dentro da lamina basal das fibras degeneradas (Ide, 1996; Dahlin; Brandt, 2004). As células de Schwann, arranjadas nas bandas de Büngner proporcionam um tropismo mecânico, guiando os axônios em regeneração aos seus alvos e são essenciais para a regeneração nervosa uma vez que elas provem um ambiente permissivo ao crescimento axonal e são fontes de fatores neurotróficos (Ide, 1996; Son et al., 1996; Radtke et al., 2005; Bhatheja; Field, 2006; Kartje, 2006).

Múltiplos brotos axonais surgem, usualmente, dos nodos de Ranvier localizados nas proximidades do segmento proximal à lesão dentro de aproximadamente 1 hora após a injúria nervosa (Kartje, 2006). Estes se estendem através do espaço entre a lâmina basal e a membrana das células de Schwann ou bainha de mielina no segmento proximal, atravessam a estreita fenda de tecido conjuntivo entre os cotos proximal e distal, e finalmente entram no segmento distal (Ide, 1996). Os axônios em regeneração no segmento distal crescem pela fixação da membrana de seus cones de crescimento à superfície interna da

lâmina basal e/ou sobre a membrana plasmática das células de Schwann, mas não pelos fragmentos de mielina. Isto indica que substâncias favoráveis à regeneração axonal podem ser expressas tanto na superfície interna da lâmina basal quanto na membrana plasmática das células de Schwann e, em contraste, a mielina é considerada como um repelente à fixação dos axônios em regeneração no segmento distal à lesão (Ide, 1996; Dahlin; Brandt, 2004).

Os cones de crescimento axonal em regeneração podem seletivamente exibir diferentes moléculas de adesão em suas membranas. A fixação axônio-célula de Schwann é mediado por várias moléculas, incluindo a molécula neural de adesão celular (N-CAM), L1, N-caderina e E-caderina, enquanto o contato axônio-lâmina basal e em sua maior parte mediado pela ligação laminina-integrina. Estas moléculas têm sua expressão aumentada na superfície das células de Schwann que se posicionam formando as bandas de Büngner e na membrana plasmática dos axônios em regeneração. Contudo, quando as células de Schwann re-estabelecem o contato com os axônios e iniciam a formação de mielina, a expressão de N-CAM e L1 é rapidamente suprimida e quase indetectada (Ide, 1996; Dahlin; Brandt, 2004).

Além da capacidade de fornecer um meio mecânico para o crescimento dos axônios em regeneração, as células de Schwann são responsáveis pela produção de fatores de crescimento que promovem a sobrevivência e estimulam o crescimento axonal, tais como o fator de crescimento neural (NGF) e o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) exercendo assim uma função trófica na ausência da inervação dos órgãos alvo. Os cones de crescimento por sua vez, expressam proteínas de membrana que são receptores para estes fatores tróficos, tais como receptor de baixa afinidade p75 e receptores tirosino-quinase A, B e C (TrKA, TrKB e TrKC, respectivamente), possibilitando assim a ação trófica destes fatores (Tonge; Golding, 1993; Ide, 1996; Dahlin; Brandt, 2004).

Durante a regeneração, o re-estabelecimento do contato axônio-célula de Schwann estimula a remielinização das fibras nervosas regeneradas e o retorno da

transmissão eletroquímica até os efetores (Schröder, 1975; Ide, 1996; Son et al., 1996). Finalmente, o sucesso da recuperação inclui a correta reinervação dos tecidos alvos e o adequado retorno da função.

1.4 Exercício físico e neuropatias periféricas

Terapias empregando programas de exercícios físicos são freqüentemente utilizadas na reabilitação de pacientes com neuropatias periféricas. Os exercícios físicos diminuem as complicações comuns às patologias do SNP, tais como as contraturas e fraqueza dos músculos desnervados, promovem a recuperação funcional e o aumento da capacidade aeróbica de pacientes com DNM (Herbison et al., 1983, Linderman et al., 1995, Wright et al., 1996).

Na síndrome aguda do nervo ciático, ou ciática, o tratamento conservador consiste em repouso nas duas primeiras semanas após a lesão, administração de drogas antiinflamatórias e a realização de exercícios aeróbicos após este período inicial (Bell; Rothman, 1984; Vroomen et al., 2000). Embora, na prática clínica, os exercícios físicos sejam recomendados, existem grandes dificuldades na realização de pesquisas científicas com pacientes que comprovem seu benefício.

Estudos clínicos têm sugerido que muitos pacientes, acometidos por DNM, beneficiam-se com o exercício (Linderman et al., 1995; Wright et al., 1996). Entretanto, estas pesquisas apresentam substanciais comprometimentos metodológicos, tais como o pequeno número de pacientes, a grande diversidade clínica apresentada pelas desordens, além da combinação de outras intervenções além do exercício físico e a não realização de grupos controles adequados em virtude do correto manejo ético. Além disso, na literatura clínica ainda existem grande discordância sobre a utilização de diferentes programas de exercícios físicos, ou seja, de resistência muscular ou aeróbico.

Com o intuito de responder estas questões, o efeito do exercício físico nas lesões dos NPs têm sido estudado em modelos animais. Entretanto controvérsias têm sido relatadas em seus resultados. Estudos prévios demonstraram que a prática de natação e de prolongada caminhada (*wheel running*), durante o período de desnervação muscular ocasionado por lesão do nervo ciático em ratos, foi capaz de diminuir a atrofia dos músculos desnervados (Jaweed et al., 1974, Irintchev et al., 1991).

Em outro estudo, ratos com esmagamento do nervo ciático foram forçados a alcançar o bico de sua garrafa de água no topo da caixa moradia, sendo assim, forçados a realizar exercícios com seus membros posteriores por 4 horas diárias e durante 24 dias após a lesão. Este protocolo de exercício mostrou acelerar a recuperação funcional e a velocidade de condução dos nervos motores (Van Meeteren, et al., 1997). A hiperatividade do músculo sóleo desnervado em ratos, realizada pela imobilização do membro posterior contralateral a lesão do nervo ciático, aumentou o diâmetro médio das fibras nervosas mielinizadas quando comparada com os efeitos da imobilização no membro ipsilateral a lesão (Eisen et al., 1973).

Além disso, o suporte do próprio peso corporal parece ser um importante fator na recuperação da função neural. Ratos com compressão do nervo ciático que suportam seus próprios pesos apresentaram ganho na tenção tetânica muscular e na recuperação funcional quando comparados com animais que tiveram suas patas posteriores suspensas (Matsuura et al., 2001).

Por outro lado, um estudo demonstrou que a natação não interfere com a recuperação sensório-motora após lesão do nervo ciático e que um programa intermediário de caminhada em esteira retarda a recuperação em ratos (Van Meeteren et al., 1998). Também foi observado que a atividade motora intensa, realizada diariamente (natação) em ratos com esmagamento do nervo ciático leva a deficiências na diferenciação das fibras em regeneração (Gutmann; Jakoubek, 1963).

Entretanto, além das discrepâncias nos resultados obtidos por estes prévios estudos, eles não especificam o tipo de treino empregado (aeróbico ou de resistência muscular), nem discutem se as suas respectivas ações no processo de regeneração nervosa poderiam ser diferentes.

No sistema neuromuscular intacto de modelos animais, diferentes protocolos de exercícios têm demonstrado exercer distintas ações, o que remete à possibilidade de que estes efeitos dependentes do tipo de treinamento também ocorram quando o exercício é aplicado na reabilitação após lesões do sistema nervoso. Por exemplo, treinamentos aeróbicos não causam uma significativa hipertrofia muscular, embora aumentem a atividade colinesterásica (ChE) total e resultem em significativa expansão dos componentes pré e pós-sinápticos da junção neuromuscular em ratos (Crockett et al., 1976; Tomas et al., 1997). Por outro lado, treinamentos de resistência muscular com altas cargas resultam em adaptações neurais e hipertrofia muscular, as quais são responsáveis pelo aumento da força dos músculos treinados (Deschenes et al., 2000; Lee et al., 2004).

Desta forma, a especificidade do treinamento é um fator importante e deve ser levada em consideração dentro do contexto da regeneração nervosa quando se busca estudar os efeitos do exercício físico após lesões do sistema nervoso.

2 HIPÓTESE DE TRABALHO

Embora existam vários estudos aplicando o exercício físico como terapia para reabilitação de modelos animais com lesões nervosas periféricas, o conhecimento dos efeitos da especificidade do treinamento é um tema que permanece pouco esclarecido.

Na prática clínica, diversos programas de atividades físicas são empiricamente empregados em pacientes com neuropatias periféricas, muitas vezes baseados apenas em estudos de casos isolados ou na experiência do terapeuta. A falta de conhecimento científico específico, dentro desta área, deve-se muito a dificuldade da realização de estudos randomizados e controlados quando se propõe uma modalidade terapêutica em seres humanos.

Com base nas dificuldades em produzir conhecimento clínico-científico e na ausência de estudos experimentais que discutam possíveis diferenças na regeneração nervosa periférica ocasionada por distintos protocolos de atividades físicas, isto é, exercícios aeróbicos ou de resistência muscular, este estudo busca demonstrar que assim como ocorre em um sistema neuromuscular íntegro, onde as alterações morfofisiológicas podem ser diferentemente moduladas através da aplicação de diferentes atividades físicas, o sistema nervoso lesionado também responde de forma diferente a distintos estímulos físicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos de cinco semanas de treinamento físico aeróbico, de resistência muscular e a combinação de ambos na regeneração nervosa periférica em ratos machos adultos após lesão traumática experimental do nervo ciático direito.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar um acompanhamento temporal da recuperação funcional da locomoção através do método de livre caminhada associado a plantimetria dos membros posteriores para a quantificação do índice de funcionalidade do nervo ciático durante o período dos treinamentos em ratos machos adultos (*Wistar*) após compressão do nervo ciático direito;

- Avaliar a regeneração do nervo ciático, utilizando uma análise morfométrica da densidade de fibras mielínicas, estimativa da área média das fibras mielínicas, espessura média da bainha de mielina, porcentagem da área de fibras mielínicas e porcentagem da área de tecido conjuntivo endoneural, nas porções proximal e distal à lesão, após cinco semanas de treinamento físico específico em ratos machos adultos com compressão do nervo ciático direito.

4 MÉTODOS E RESULTADOS

- 4.1 Artigo -** Jocemar Ilha, Rafaela T. Araujo, Tais Malysz, Erica E.S. Hermel; Paula Rigon, Léder L. Xavier, Matilde Achaval. **Endurance and resistance exercise training elicits specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats.**

**Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects
on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats**

Jocemar Ilha^{a,b}, Rafaela T. Araujo^{a,b}, Tais Malysz^{a,b}, Erica E.S. Hermel^b; Paula Rigon^{a,b},
Léder L. Xavier^c, Matilde Achaval^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

^bLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS,
Brazil

^cLaboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas,
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

Footnotes to the title: Specificity of exercise training on sciatic nerve regeneration

Communicating author: Matilde Achaval

Laboratório de Histofisiologia Comparada

Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sarmiento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: achaval@ufrgs.br

Tel.: +55-51-33083624

Fax: +55-51-33083092/33083148

Abstract

Physical exercise has been employed in experimental clinical studies with the purpose of stimulating peripheral nerve regeneration, but these studies did not examine the effects of specific types of the exercise. Here, we test the possible effects of endurance, resistance and a combination of both types of training program (for 5 weeks) on sciatic nerve regeneration after crush lesion in rats using both functional and nerve morphometric analyses. The findings indicate that endurance training enhances the functional recovery from the first week of training, and the morphological differentiation of regenerating sciatic nerves after 5 weeks of training when compared to sedentary injured animals. On the other hand, the resistance training and the combination of endurance-resistance training, i.e. concurrent training, retarded functional recovery, but did not prevent it. Furthermore, 5 weeks of resistance and concurrent training did not enhance the morphological differentiation of regenerating sciatic nerve when compared with endurance-trained animals. In this study, the differentiation of regenerating nerves in the concurrent and resistance-trained rats was similar to that of sedentary injured animals. These data provide evidence that moderate endurance training has great potential for improving functional recovery and enhancing sciatic nerve regeneration after experimental traumatic injuries, and that resistance and concurrent training appear to delay functional recovery and not to interfere in differentiation of regenerating sciatic nerve fibers.

Keywords: Sciatic nerve crush; Endurance training; Resistance training; Concurrent training; Specific exercise; Functional recovery; Peripheral nerve regeneration; Stereological analysis

Introduction

Neuromuscular diseases (NMDs) are acquired or hereditary disorders of the muscle, neuromuscular junction (NMJ), motoneuron (MN) or peripheral nerves (PNs). Injuries to PNs result in a partial or total loss of motor, sensory, and autonomic functions in the related segments of the body in both man and experimental models (De Medinaceli, 1982; Bennett and Xie, 1988; Varejão et al., 2001; Rodríguez et al., 2004; Vallat and Magy, 2005; Hama and Borsook, 2005). PNs are damaged by different factors such as acute trauma, chronic repetitive insults, and inheritable or acquired metabolic disorders (Stone and Keenan, 1988; Kartje and Schwab, 2006). Exercise therapies are frequently used in the rehabilitation of patients with peripheral neuropathies. Physical exercise decreases the complications such as contractures and weakness of denervated muscles, and promotes functional recovery and improvement in aerobic capacity of patients with NMDs (Herbison et al., 1983, Linderman et al., 1995, Wright et al., 1996).

It is well established that physical activity can promote plasticity in muscular tissue, NMJs and PNs (Crockett et al., 1976; Gonyea and Sale, 1982; Tomas et al., 1997; Kanda and Hashizume, 1998; Deschenes et al., 2006). The specificity of the training has been documented in the neuromuscular system, so that endurance training does not cause a significant degree of muscle hypertrophy, but enhances total cholinesterase (ChE) activity and results in significant expansion of pre- and post-synaptic components of the neuromuscular junctions in rats (Crockett et al., 1976; Tomas et al., 1997). On the other hand, typical resistance training with high loads results in neural and muscle hypertrophic adaptations responsible for improved strength of the trained muscle (Deschenes et al., 2000; Lee et al., 2004). Furthermore, there is growing evidence that physical exercise is capable of favorably influencing brain plasticity by facilitating neurogenerative, neuroadaptive, and

neuroprotective processes (Ra et al., 2002; for review, see Dishman et al., 2006). However, there is a need for a more complete characterization of the effects of physical activity on specific elements of the form and function of the nervous system (NS) in healthy and damaged tissue in both human and experimental animal models. For example, it is necessary to know how the impact of exercise is influenced by the type of exercise and the type of NS damage.

Experimental clinical studies have employed physical exercise in the rehabilitation of traumatic injury of the sciatic nerve with the purpose of stimulating nerve regeneration and improving functional recovery, however conflicting results have been obtained. Previous studies showed that swimming and prolonged wheel running in rats during denervation period were capable of decreasing the atrophy of denervated muscle (Jaweed et al., 1974, Irintchev et al., 1991). Rats forced to exercise by stretching maximally to reach the nipple of the bottle suspended from the top of a plexiglass box daily for 4 hours, for 24 days after the sciatic nerve crush enhanced functional recovery and the motor nerve conduction velocity (Van Meeteren, et al., 1997). In addition, the support of the weight bearing seems to facilitate recovery of neural function, muscle weight and tetanic tension in rats with sciatic nerve compression (Matsuura et al., 2001). The forced hyperactivity of denervated soleus muscle in rat by immobilization of contralateral hindlimb enlarged the mean diameter of regenerating myelinated nerve fibers when compared with the immobilized contralateral denervated soleus muscle (Eisen et al., 1973). On the other hand, one study showed that swimming training did not interfere with sensorimotor recovery after sciatic nerve injury and that a mild program of treadmill running retarded the recovery in rats (Van Meeteren et al., 1998). Furthermore, another study showed that intensive daily motor activity (swimming) in rats with sciatic nerve crush leads to deficiencies in differentiation of regenerating nerve fibers (Gutmann and Jakoubek, 1963). However, these previous studies, while describing the effects of exercise on

PN lesion neither specified the training type (i.e., phasic or tonic, resistance or endurance), nor discussed whether their respective actions might have different outcomes in terms of PN regeneration.

In order to elucidate on the possibility that different exercise training programs have different effects on peripheral nerve regeneration; while, taking into consideration that (a) sciatic nerve crush causes axonal degeneration and locomotor impairment; and (b) physical exercise is widely used in clinical and experimental PN damage, in order to accelerate nerve regeneration and functional recovery; the aim of the present study was to evaluate the specific effects of endurance, resistance and a combination of both types of training program (concurrent training) on locomotor function recovery and morphological differentiation of regenerating nerve after sciatic nerve crush lesion in rats using a functional and nerve morphometric analysis.

Materials and methods

Experimental design and surgical procedures

The experiment was performed on 37, three month old, male Wistar rats, weighing 280-330 g (initial age and weight) from a local breeding colony (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil). The rats were housed in standard plexiglass box, under 12:12 h light/dark cycle, in a temperature controlled environment (20 ± 1 °C), with food and water available *ad libitum*. All the animals were cared for in accordance with Brazilian law and the recommendations of the Brazilian Society for Neurosciences, Review Committee of the School of Veterinary Surgery, University of Buenos Aires and the International Brain Research Organization (IBRO), and are in compliance with the National Institute of Health's Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals (publication no. 85-23, revised 1985).

In the first step of the procedure, the animals were randomly divided in five groups: (1) rats without sciatic crush and unexercised, control (CON, n = 8); (2) rats with sciatic crush and unexercised, sedentary (SED, n = 7); (3) rats with sciatic crush and endurance-trained (ET, n = 7); (4) rats with sciatic crush and resistance-trained (RT, n = 7); and, (5) rats with sciatic crush and endurance-resistance-trained, concurrent training (CT, n = 8). The animals of the SED, ET, RT and CT groups were anesthetized using ketamine and xilazine (90 and 15 mg/kg, i.p., respectively; Vetbrands, Brazil) and the right sciatic nerve was crushed with 1 mm hemostatic forceps for 30 seconds, as previously described by Bridge and coworkers (1994). Seven days later, all animals were adapted in the treadmill during 10 minutes at 5 m.min⁻¹ for 4 days, in the fifth day they were submitted at Maximal Exercise Test (MET), according to Melo and coworkers (2003). At the beginning of the third week after the sciatic nerve crush, the animals of the ET, RT and CT groups began the exercise training.

Endurance training

The endurance training program was performed in a treadmill for human begins (Runner, Brazil) modified for use in rats. This training program consisted of running in a treadmill during 20 min on the first day, being progressively increased every day up to 50 min on the 5th day and 60 min in the next 4 weeks. Each training session included a warm-up period of 5 min running at 30% of the maximal speed reached in the MET, 10-50 min running at 45-50% and 5 min recovery at 30%, 5 sessions per week, once a day (adapted from Carvalho et al., 2005). The total training period was 5 weeks.

Resistance training

The resistance training program consisted of climbing a 1 m long ladder, set at an 80° angle with a weight attached to the animals' tails. The length of the ladder required the

animals to make 8-12 dynamic movements (reps) per climb. Each exercise session included 8 repetitions, at 2 min intervals, of ladder climbing. The resistance applied to the rats was progressively increased by 50 g every new week so that at the start of the program the resistance carried by animals was 50 g, while at the end it was 250 g. The resistance training program included 3 sessions per week with 48-72 h rest between sessions during 5 weeks (adapted from Deschenes et al., 1994).

Concurrent training

The concurrent training program consisted of the aforementioned resistance and endurance training programs. The resistance training was completed first, and then after a 15 min interval, the animals did the endurance training.

Analysis of motor function

All animals were subjected to a series of motor activity assessments one day before and 1, 2, 3, 4 and 5 weeks after completing the physical training programs. Recovery of locomotor activity was considered proof of adequate reinnervation of the right hindlimb and functional recovery post lesion and was monitored by analysis of the free walking pattern. This method was originally proposed in 1982 (De Medinaceli et al., 1982) and describes an index based on measurements of the footprints of walking rats, which provides a reliable and easily quantifiable method of evaluating the functional condition of the sciatic nerve. For this test, the rats were trained to walk over a white sheet of paper covering the bottom of a 100-cm-long, 8.5-cm-wide track ending in dark box. Afterwards, the animals had their ventral hind feet painted with dark dye and, then, they were placed on the track to walk.

The rats' footprints were used to determine the following measurements: (1) distance from the heel to the third toe, the print length (PL); (2) distance from the first to the fifth toe,

the toe spread (TS); and (3) distance from the second to the fourth toe, the intermediary toe spread (ITS). All three measurements were obtained from the experimental (E) and normal (N) sides (Koka and Hadlock, 2001; Varejão et al, 2001). Several prints of each foot are obtained on each track, but only three prints of each foot were used to determine the mean measurements in the E and N sides. Then, these mean were included in the sciatic function index-formula:

$$SFI = -38.3 (EPL - NPL) / NPL + 109.5 (ETS - NTS) / NTS + 13.3 (EIT - NIT) / NIT - 8.8$$

(Koka and Hadlock, 2001; Varejão et al, 2001).

The result obtained was considered an index of the functional conditions of the sciatic nerve, where zero (± 11) represents normal function and about -100 represents the loss that results from a complete transection of the sciatic nerve fibers (De Medinaceli et al., 1982).

Morphological nerve studies

After 5 weeks of physical training the animals were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.; Cristália, Brazil) and decapitated. For nerve regeneration analysis, two short segments (~ 3 mm) of the right sciatic nerve were rapidly excised from the proximal (P) and distal (D) portions of the nerve. The specimens were fixed by immersion in 0.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co., USA) and 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4, PB). After, they were post-fixed in 1% OsO₄ (Sigma Chemicals Co., USA) in PB, dehydrated in a graded series of alcohol and propylene oxide (Electron Microscopy Science, USA), embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland) and polymerized at 60° C (Hermel et al., 2006). Cross-semithin sections (1 μ m) were obtained using an ultramicrotome (MT 6000-XL, RMC, Tucson, USA) and stained with 1% toluidine blue (Merck, Germany) in 1% sodium tetraborate (Ecibra, Brazil).

Afterwards, images of the P and D portions of the right sciatic nerve were captured and digitalized (initially 1000x and further amplified 200% for analysis) using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Japan) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Image Pro Plus Software 4.1 (Media Cybernetics, USA). Both P and D portions of the right sciatic nerves were separately analyzed and 6 locations were examined for each specimen, 3 at the periphery of the nerve and 3 at its center, according to De Medinaceli (1995). The total area examined in each segment (P and D) of the nerve was $4,082.4 \mu\text{m}^2$ and the average number of fibers analyzed per segment was 81. Morphometric measurements included the myelinated fiber density; the estimation of the average myelinated fiber area; average myelin sheath thickness; percentage areas of myelinated fibers and of endoneurial connective tissue, the latter included the unmyelinated fibers and degenerating debris. These morphological parameters were chosen to assess the differentiation of regenerating sciatic nerves.

Individual myelinated fibers were manually counted and the myelinated fiber density was determined by examining the ratio of the myelinated fibers/total area analyzed. The average myelin sheath thickness was automatically calculated by the Image Pro plus program, and the estimated areas were obtained using the point counting method (Gundersen and Jensen, 1987; Hermel et al., 2006). The value of the areas was calculated using the equation:

$$A = \sum p \cdot a/p$$

Where A is area, $\sum p$ the total of counted areas/point and a/p the area/point value ($3.24 \mu\text{m}^2$, value determined in the Image Pro Plus Program).

Statistical analysis

The group means were analyzed using repeated measures analysis of variance (ANOVA). The differences between the groups were assessed using Fisher's LSD post-hoc

for SFI ($n = 7-8$ per group) and for morphological measurements ($n = 5$ per group). Data were run on SPSS[®] 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA) with significance set at $p < 0.05$. All means are presented \pm standard error of the mean (SEM).

Results

Sciatic functional index (SFI)

In order to calculate the SFI, a total of 1,332 footprints were analyzed, including pre-training and 1, 2, 3, 4 and 5 post-training week records. SFI data curves are presented as mean \pm SEM and shown in Fig. 1.

One day before physical training [$F(4, 36) = 99.59, p < 0.001$], the *post hoc* comparisons of SFI showed a statistical difference between the control group (CON; $-4.98 \pm 2.61; p < 0.001$) and experimental groups (SED, ET, RT and CT; Fig. 1A - D). This result indicated a loss of motor function in the right hindlimb in the all operated groups, which confirms that the sciatic nerve crush was really fully effective.

From the first post-training week [$F(4, 36) = 4.60, p = 0.005$], the *post hoc* comparisons showed no significant difference in the SFI of the ET and SED groups when compared with CON ($-5.61 \pm 0.91; p > 0.05$), although the ET showed a better SFI than SED (Fig. 1A and B). Furthermore, the SFI of the RT and CT groups were significantly lower than those of CON and ET ($p < 0.02$; Fig. 1C - F).

In the second post-training [$F(4, 36) = 4.89, p = 0.003$], the *post hoc* test showed a statistically significant difference between the SFI of the SED and CON groups ($-3.8 \pm 1.09; p < 0.02$; Fig. 1A). The average SFI for RT was still significantly lower than those of CON and ET ($p < 0.02$; Fig. 1C and E), and the SFI for CT was significantly lower only than that of CON ($p = 0.005$; Fig. 1D).

In the third post-training week [$F(4, 36) = 2.12, p=0.101$], the *post hoc* comparisons only showed statistical differences between the RT and CON groups ($p = 0.016$; Fig. 1C), and between the RT and ET groups ($p = 0.037$; Fig. 1E).

In the fourth [$F(4, 36) = 1.28, p = 0.298$] and fifth post-training week [$F(4, 36) = 0.06, p = 0.992$] no statistical differences between the SFI of the groups were found.

Morphological data

Structural analysis of regenerating nerves revealed important differences between the control (CON) and experimental groups (SED, ET, RT and CT). These differences were predominantly found in the D portion of regenerating sciatic nerve and are summarized in Fig. 2.

Qualitative observation revealed a slight reduction in myelinated fiber size at the P portion of the nerve from SED when compared with other groups. At the D portion this reduction was greater in all experimental groups when compared with the respective P portion and with the CON group. However, in the ET group, the D portion of the regenerating nerve showed the myelinated fiber size to be more similar to its P portion and with the CON group.

The myelin sheath thickness was seen to be similar in appearance at the P portion of the CON and experimental groups. At the D portion a large reduction in myelin sheath thickness was observed in the experimental groups. Nevertheless, the ET group seemed to have the largest myelin sheath thickness when compared to the other experimental groups.

At the D portion, the endoneurial space between the myelinated fibers in the experimental groups was seen to be greater when compared with CON group. In addition, SED, RT and CT groups showed a greater amount of degeneration debris in the endoneurial space than ET group.

Morphometric analysis revealed the significant differences in the density of the myelinated fibers at the D portion in the experimental groups when compared with the CON group ($15,236 \pm 1,152$ fibers/mm²; $p < 0.05$; Fig. 3B), but no differences were found at the P portions between the groups ($p > 0.05$, Fig. 3A).

The average myelinated fiber area showed significant differences between the groups at both the P and D portions [$F(4,20) = 11.97$, $p < 0.001$]. *Post hoc* comparisons of average myelinated fiber area at the P portion revealed that the CON and RT groups were statistically different from the SED group (27.9 ± 3.8 μm²; $p < 0.05$; Fig. 3C). At the D portion experimental groups showed significant differences in the average myelinated fiber area when compared to the CON group (45.8 ± 5.4 μm²; $p < 0.001$; Fig. 3D).

In the myelin sheath thickness, statistical differences were found in the average myelin sheath thickness of the groups at both the P and D portions [$F(4,20) = 7.39$, $p = 0.001$]. At the P portion, the *post hoc* comparisons showed that the average myelin sheath thickness of the RT group was larger than the SED group (0.88 ± 0.05 μm; $p < 0.05$; Fig. 3E). At the D portion, significant differences were found between the CON (1.09 ± 0.06 μm; $p < 0.001$) and experimental groups, but the ET group (0.73 ± 0.07 μm) showed a larger average myelin sheath thickness than the SED, RT and CT groups ($p < 0.02$; Fig. 3F).

No differences in the morphometric measurements of the percentage area of myelinated fibers were found at the P portion of regenerating nerves of the groups (Fig. 4A), but at the D portion there were significant differences between the groups [$F(4,20) = 18.33$, $p < 0.001$]. *Post hoc* comparisons between the groups revealed statistical differences in the percentage area of myelinated fibers at the D portions of the experimental groups in relation to the CON group (67 ± 3 %, $p < 0.001$; Fig. 4B). Furthermore, the ET group (37 ± 3 %) showed a greater percentage area of myelinated fibers at the D portion than the SED group ($p < 0.02$; Fig. 4B).

Analysis of the morphometric measurements of percentage area of endoneurial connective tissue showed no statistical differences at the P portion of regenerating nerves of the groups (Fig. 4C). However, there were significant differences between the groups at the D portions [F (4,20) = 18.33, $p < 0.001$]. *Post hoc* comparisons between the groups revealed statistical differences in the percentage area of endoneurial connective tissue at the D portions of the experimental groups in relation to the CON group ($32 \pm 3 \%$, $p < 0.001$; Fig. 4D). Furthermore, at the D portion, the ET group ($63 \pm 3 \%$) showed a smaller percentage area of endoneurial connective tissue than the SED group ($p < 0.02$; Fig. 4D).

Discussion

Previous studies have shown that exercise training is capable of influencing the course of peripheral nerve regeneration (Gutmann and Jakoubek, 1963; Eisein et al., 1973; Molteni et al., 2004), but these studies did not test to see whether there is any difference in the results obtained when endurance or resistance physical exercise are used. The present study used the rat sciatic nerve crush model in order to investigate the hypothesis that specific exercise training, started after acute stage of nerve injury (i.e., 2 weeks after the crush), would have different effects on functional recovery and produce morphological differentiation of regenerating nerves.

Our findings showed that endurance training enhanced functional recovery from the first week of training, and produced morphological differentiation in the regenerating sciatic nerves after 5 weeks of training when compared to sedentary injured animals. On the other hand, resistance training and a combination of endurance-resistance training, i.e. concurrent training, retarded functional recovery, but did not prevent it. The concurrent and resistance-trained animals only reached normal values of SFI (± 11 according to De Medinaceli et al.,

1982) after 4 and 5 weeks of the training, respectively. Furthermore, 5 weeks of resistance and concurrent training did not enhance the morphological differentiation of regenerating sciatic nerve when compared with endurance-trained animals. The differentiation of regenerating nerves in the concurrent and resistance-trained rats was similar to that of the sedentary injured animals.

It is noteworthy that the sciatic nerve model is most commonly used in regeneration studies. It provides a nerve trunk with adequate length and space at mid-thigh for experimental surgical manipulation (Rodríguez et al., 2004). Furthermore, of the experimental models, the rat sciatic nerve provides an inexpensive source of mammalian nervous tissue that demonstrates cellular detail of the peripheral nerve that is indistinguishable from human nerve (Mackinnon et al., 1985). In addition, the experimental traumatic lesion of the sciatic nerve (crush model) has been shown to be capable of improving similar deficits in hindlimb motor function of, as found in the present study (De Medinaceli et al., 1982; Bridge et al., 1994; De Medinaceli, 1995; Ilha et al., 2006).

Motor function recovery after sciatic nerve crush has been reported to be favorably influenced by physical exercise, as evidenced by a great functional muscle afferent recovery (afferent discharge frequency recorded) after a forced treadmill running started 1 week post-lesion rest (Marqueste et al., 2004). Similarly, our results show that mild endurance training on a treadmill (speed performed at ± 9 m/min) started 2 weeks post-lesion was capable of accelerating the return of hindlimb motor function evaluated by a SFI. Nevertheless, different results were reported when the treadmill training was started 24 h after surgery. In the early post-lesion phase, the return of hindlimb function (SFI) of trained animals was less than that of untrained (Van Meeteren et al., 1998). This contradictory result may be due to the recovery time post-lesion after physical training. A previous electrophysiological study (Herbison et al., 1973) suggested that functional reinnervation of hindlimb muscles begins about 2 weeks

post sciatic nerve crush in control animals and that overwork of the muscle before this period can be harmful. In relation to the regeneration of the sciatic nerve, our findings showed that moderate endurance training accelerates differentiation. The capacity of long-term moderate physical exercise to change morphological parameters (fascicular area, fiber density and axonal diameter) of peripheral nerves has been demonstrated by Kanda and Hashizume (1998) in old rats. In their study, these authors reported that physical exercise retards the progressive age-related changes in motoneurons and PNs of exercised old rats when compared with unexercised old rats.

On the other hand, little is known about the effects of resistance training on nerve regeneration. In the present study, an important delay in both motor function recovery and regenerating nerve differentiation was found in animals that performed resistance and concurrent exercise training, though the exercise training was initiated 2 weeks post-lesion. Herbison and coworkers (1973, 1974) reported that rat soleus and plantaris muscles subjected to overwork, by elimination of the synergist muscles, at 2 weeks after sciatic nerve crush, showed similar or worse morphological and biochemical muscle changes than injured sedentary animals. In addition, intensive motor activity started after sciatic nerve crush in rats led to deficiencies in differentiation of nerve fibers, i.e., the average diameter of the myelinated nerve fibers decreased in trained animals (Gutmann and Jakoubek, 1963). However, the forced use of the denervated hindlimb muscle, by contralateral hindlimb immobilization, (Eisen et al., 1973) and the maximal stretching to the top of a plexiglass box to reach a water bottle (Van Meeteren et al., 1997), initiated after sciatic nerve crush showed, respectively, an increase in mean fiber diameter and motor nerve conduction velocity, acceleration of SFI normalization and return of sensory function. Together, these contradictory results suggest that both recovery post-lesion time and intensity of the training must be important factors for sciatic nerve regeneration after traumatic injuries. However,

sex-related differences in the regeneration of axons have been shown (Kovacic et al., 2004) and Eisen and coworkers (1973) carried out their experiments with female rats. This could have led to discrepancies on the interpretation of the data.

There is also a need to deal with the topic of how physical exercise affects the course of peripheral nerve regeneration. Regeneration of PNS after injury depends on a complex sequence of histopathological reactions termed wallerian degeneration. Over this period, remodeling of the distal nerve stump prepares a microenvironment that permits successful regrowth of nerve fibers from the proximal nerve segment (Schröder, 1975). In this context, the Schwann cells show an important role in axonal maintenance and regeneration (Bhatheja and Field, 2006). It is known that integration of Schwann cells into injured peripheral nerve is an important factor and provides appropriate myelination of regenerated axons (Radtke et al., 2005). This sequence of reactions is determined by a differential and coordinated expression of genes with specific functions in the process of regeneration and may be regulated by signals that appear (positive) or disappear (negative) (McPhail et al., 2005; for review see also Ide, 1996; Bosse et al., 2001; and Dahlin and Brandt, 2004).

Of the positive signals, the neurotrophin family members, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3) and neurotrophin 4 (NT-4), are the most fully characterized group of polypeptide growth factors and influence NS regeneration via two different classes of receptors, tyrosine kinase receptors (TrkA, TrkB and TrkC) and the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). In this context, a recent *in vivo* study showed that local continuous release of BDNF increased nerve fiber growth over time and induced faster nerve regeneration in rats with sciatic nerve injury when compared to the control group (Vögelin et al., 2006). In addition, BDNF and NT3 seem to be important modulatory factors of myelination in developing sciatic nerve. BDNF was found to enhance the expression of myelin associated glycoprotein (MAG) and P0 protein, and increases the

number of myelinated axons (Chan et al., 2001). Locomotor activity by treadmill training or voluntary running wheel increased the expression of BDNF, NT4 and their receptor TrkB; and, NT3 and its receptor TrkC in spinal cord of the rats (Gómez-Pinilla et al., 2001, 2002; Skup et al., 2002; Ying et al., 2003). In addition, the BDNF and TrkB expression also increased in the soleus muscle after locomotor activity (Gómez-Pinilla et al., 2001, 2002).

Furthermore, increase in muscle and serum concentration of IGF-I after endurance training has been reported in rats (Eliakim et al., 1997; Heo et al., 2001). Contradictorily, the levels of IGF-I in circulation seems to be unaffected by chronic resistance training (Heo et al., 2001; Trojan et al., 2001; Nindl et al., 2004). The IGF-I is important for nerve growth and differentiation, neurotransmitter synthesis and release, is increased in SNC after exercise and may be play a significant part in the mechanisms underlying exercise-induced cognitive enhancement (Ding et al., 2006). The IGF-I is capable of enhancing the biological activity of BDNF in neurons within the CNS (McCusker et al., 2006). In addition, muscle expression of a local IGF-I induced motor neuron survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model (Dobrowolny et al., 2005) and IGF-I and II were both shown to stimulate, *in vivo*, sciatic nerve regeneration in rats (Near et al., 1992; Glazner et al., 1993; Pu et al., 1995).

Taken together, the evidence shown in all these reports may explain the beneficial effects of endurance training on the morphological differentiation of regenerating sciatic nerve found in our study. Possibly, the less beneficial results found with resistance and concurrent training programs in relation to the endurance training program, may arise from a differentiated pattern of regulation for these growth factors in different types of training. Nevertheless, another factor must be considered when interpreting these conflicting results. The resistance and concurrent training programs employed in this study can be considered intensive exercises, and as mentioned above, overwork during sciatic nerve regeneration is harmful. Gutmann and Jakoubek (1963) reported that the deficiencies in the differentiation of

regenerating nerve fibers could be considered the result of undue demands on proteosynthesis required for growth and intensive motor activity during nerve regeneration.

In conclusion, our data provide evidence that moderate endurance training has great potential in the advancement of functional recovery and enhancement of sciatic nerve regeneration after experimental traumatic injuries. Contradictorily, resistance and concurrent training appear to delay functional recovery and not to interfere in the differentiation of regenerating sciatic nerve fibers. We suppose that the discrepant effects of the specific training programs employed in the present study result from the differentiated patterns of growth factor expression. Furthermore, the high demands on proteosynthesis required for nerve fiber growth, as well as for both resistance and concurrent training could be also relevant factors. These results can be considered as general references for future studies aimed at further elucidating the relationship between peripheral nerve injury and exercise-dependent trophic factors, and how the type of the exercise interferes in this context.

Acknowledgments

We would like to thank MSc Flávia G. Martinez, MSc Leonardo Peyré-Tartaruga and Dr Jefferson F. Loss for their help with the treadmill adaptation, and Dr Jandira M.G. Fachel, from Mathematical Center (UFRGS), for their assistance with the statistical analysis. This research was supported by UFRGS and the Brazilian funding agencies CNPq and CAPES. J.I. was supported by an MSc scholarship from CAPES and M.A. is a CNPq investigator.

References

- Bennett, G.J., Xie, Y.-K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.
- Bhatheja, K., Field, J., 2006. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1995-1999.
- Bosse, F., Küry, P., Müller, H.W., 2001. Gene expression profiling and molecular aspects in peripheral nerve regeneration. *Restor. Neurol. Neurosci.* 19, 5-18.
- Bridge, P.M., Ball, D.J., Mackinnon, S.E., Nakao, Y., Brandt, K., Hunter, D.A., Hertl, C., 1994. Nerve crush injuries: a model for axonotmesis. *Exp. Neurol.* 127, 284-290.
- Carvalho, J.F., Masuda, M.O., Pompeu, F.A.M.S., 2005. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp. Biochem. Physiol.* 140, 409-413.
- Chan, J.R., Cosgaya, J.M., Wu, Y.J., Shooter, E.M., 2001. Neurtrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14661-14668.
- Crockett, J.L., Edgerton, V.R., Max, S.R., Barnard, R.J., 1976. The neuromuscular junctions in response to endurance training. *Exp. Neurol.* 51, 207-215.

Dahlin, L.B., Brandt, J., 2004. Basic science of peripheral nerve repair: Wallerian degeneration/growth cones. *Oper. Tech. Orthop.* 14, 138-145.

De Medinaceli, L., Freed, W.J., Wyatt, R.J., 1982. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neurol.* 77, 634-643.

De Medinaceli, L., 1995. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J. Neurosci. Methods* 58, 29-37.

Deschenes, M.R., Maresh, C.M., Armstrong, L.E., Covault, J., Kraemer, W.J., Crivello, J.F., 1994. Endurance and resistance exercise induce muscle fiber type specific responses in androgen binding capacity. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 50, 175-179.

Deschenes, M.R., Judelson, D.A., Kramer, W.J., Meskaitis, V.j., Volek, J.S., Nindl, B.C., Harman, F.S., Deaver, D.R., 2000. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. *Muscle Nerve* 23, 1576-1581.

Deschenes, M.R., Tenny, K.A., Wilson, M.H., 2006. Increased and decreased activity elicits specific morphological adaptations of the neuromuscular junction. *Neuroscience* 137, 1277-1283.

Ding, Q., Vaynman, S., Akhavan, M., Ying, Z., Gómez-Pinilla, F., 2006. Insuli-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience* 140, 823-833.

Dishman, R.K., Berthoud, H.-R., Booth, F.W., Cotman, C.W., Edgerton, V.R., Fleshner, M.R., Gandevia, S. C., Gomez-Pinilla, F., Greenwood, B.N., Hillman, C.H., Kramer, A.F., Levin, B.E., Moran, T.H., Russo-Neustadt, A.A., Salamone, J.D., Van Hoomissen, J.D., Wade, C.E., York, D.A., Zigmond, M.J., 2006. Neurobiology of exercise. *Obesity* 14, 345-356.

Dobrowolny, G., Giacinti, C., Pelosi, L., Nicoletti, C., Winn, N., Barberi, L., Molinaro, M., Rosenthal, N., Musarò, A., 2005. Muscle expression of a local IGF-1 isoform protects motor neurons in a ALS mouse model. *J. Cell Biol.* 168, 193-199.

Eisen, A.A., Carpenter, S., Karpati, G., Bellavance, A., 1973. The effect of muscle hyper- and hypoactivity upon fibre diameters of intact and regenerating nerves. *J. Neurol. Sci.* 20, 457-469.

Eliakim, A., Moromisato, M., Moromisato, D., Brasel, J.A., Roberts, C., Cooper, D.M., 1997. Increase in muscle IGF-I protein but not IGF-I mRNA after 5 days of endurance training in young rats. *Am. Physiol.* 273, R1557-R1561.

Glazner, G.W., Lupien, S., Miller, J.A., Ishii, D.N., 1993. Insulin-like growth factor II increases the rate of sciatic nerve regeneration in rats. *Neuroscience* 54, 791-797.

Gómez-Pinilla, F., Ying, Z., Opazo, P., Roy, R.R., Edgerton, V.R., 2001. Differential regulation by Exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1078-1084.

Gómez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R.R., Molteni, R., Edgerton, V.R., 2002. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J. Neurophysiol.* 88, 2187-2195.

Gonyea, W.J., Sale, D., 1982. Physiology of weight-lifting exercise. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 63, 235-237.

Gundersen, H.J.G., Jensen, E.B., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* 147, 229-263.

Gutmann, E., Jakoubek, B., 1963. Effect of increased motor activity on regeneration of the peripheral nerve in young rats. *Physiol. Bohemoslov.* 12, 463-468.

Hama, A.T., Borsook, D., 2005. Behavioral and pharmacological characterization of a distal peripheral nerve injury in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 170-181.

Heo, Y.-R., Kang, C.-W., Cha, Y.-S., 2001. Influence of exercise-training on insulin-like growth factor I and II in rats. *Nutr. Res.* 21, 1191-1199.

Herbison, G.J., Jaweed, M.M., Diturno, J.F., Scott, C.M., 1973. Effect of overwork during reinnervation of rat muscle. *Exp. Neurol.* 41, 1-14.

Herbison, G.J., Jaweed, M.M., Gordon, E.E., Diturno, J.F., 1974. Overwork of denervated skeletal muscle: effect on muscle proteins in rats. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 55, 202-20205.

Herbison, G.J., Jaweed, M.M., Diturtno, J.F., 1983. Exercise therapies in peripheral neuropathies. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 64, 201-205.

Hermel, E.E.S., Ilha, J., Xavier, L.L., Rasia-Filho, A.A., Achaval, M., 2006. Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci. Lett.* 405, 153-158.

Ide, C., 1996. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res.* 25, 101-121.

Ilha, J., Peyré-Tartaruga, L.A., Araujo, R.T., Metsen, F., Malysz, T., Canto, F., Achaval, M., Loss, J.F., 2006. Locomotor behaviour assessment in the rat by kinematic analysis. *J. Biomech.* 39, S507.

Irintchev, A., Carmody, J., Wernig, A., 1991. Effets on recovery of soleus and extensor digitorum longus muscle of prolonged wheel running during a period of repeated nerve damage. *Neurosci.* 44, 515-519.

Jaweed, M.M., Herbison, G.J., Diturtno, J.F., 1974. Effect of swimming on compensatory hypertrophy of reinnervating soleus and plantaris muscle. *Am. J. Phys. Med.* 53, 35-40.

Kanda, K., Hashizume, K., 1998. Effects of long-term physical Exercise on age-related changes of spinal motoneurons and peripheral nerves in rats. *Neurosci. Res.* 31, 69-75.

Kartje, G.L., Schwab, M.E., 2006. Axonal growth in the adult mammalian nervous system: regeneration and compensatory plasticity. In: Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T., Price,

D.L. (eds.), *Basic Neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 517-527.

Koka, R., Hadlock, T.A., 2001. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection. *Exp. Neurol.* 168, 192-195.

Kovacic, U., Zele, T., Osredkar, J., Sketelj, J., Bajrovic, F.F., 2004. Sex-related differences in the regeneration of sensory axons and recovery of nociception after peripheral nerve crush in the rat. *Exp. Neurol.* 189, 94-104.

Lee, S., Barton, E.R., Sweeney, H.L., Farrar, R.P. 2004. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J. Appl. Physiol.* 96, 1097-1104.

Linderman, E., Leffers, P. Spaans, F., Drukker, J., Reulen, J., Kerckhoffs, M., Köke, A., 1995. Strength training in patients with myotonic dystrophy and hereditary motor and sensory neuropathy: a randomized clinical trial. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 76, 612-620.

Matsuura, T., Ikata, T., Takata, S., Kashiwaguchi, S., Niwa, M., Sogabe, T., Koga, K., 2001. Effect of weight bearing on recovery from nerve injury in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 91, 2334-2341.

Mackinnon, S.E., Hudson, A.R., Hunter, D.A., 1985. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast. Reconstr. Surg.* 75, 384-388.

Marqueste, T., Alliez, J.-R., Alluin, O., Jammes, Y., Decrecí, P., 2004. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. *J. Appl. Physiol.* 96, 1988-1995.

McCusker, R.H., McCrea, K., Zunich, S., Dantzer, R., Broussard, S.R., Johnson, R.W., Kelley, K.W., 2006. Insulin-like growth factor-I enhances the biological activity of brain-derived neurotrophic factor on cerebrocortical neurons. *Journal of Neuroimmunology* 179, 186-190.

McPhail, L.T., Oschipok, L.W., Liu, J., Tetzlaff, W., 2005. Both positive and negative factors regulate gene expression following chronic facial nerve resection. *Exp. Neurol.* 195, 199-207.

Melo, R.M., Martinho, E., Michelini, L.C., 2003. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR. Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hipertension* 42, 851-857.

Molteni, R., Zheng, J.-Q., Ying, Z., Gómez-Pinilla, F., Twiss, J.L., 2004. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8473-8478.

Near, S.L., Whalen, L.R., Miller, J.A., Ishii, D.N., 1992. Insulin-like growth factor II stimulates motor nerve regeneration. *Proc. Natl. Acade. Sci. USA* 89, 11716-11720.

Nindl, B.C., Headley, S.A., Tuckow, A.P., Pandorf, C.E., Diamandi, A., Khosravi, M.J., Welles, R., Jones, M., Germain, M., 2004. IGF-I system responses during 12 weeks of resistance training in end-stage renal disease patients. *Growth Horm. IGF Res.* 14, 245–250.

Pu, S.-F., Zhuang, H.-X., Ishii, D.N., 1995. Differential spatio-temporal expression of the insulin-like growth factor genes in regenerating sciatic nerve. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 34, 18-28.

Ra, S.-M., Kim, H., Jang, M.-H., Shin, M.-C., Lee, T.-H., Lim, B.-V., Kim, C.-J., Kim, E.-H., Kim, K.-M., Kim, S.-S., 2002. Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats. *Neurosci. Let.* 333, 123-126.

Radtke, C., Akiyama, Y., Lankford, K.L., Vogt, P.M., Krause, D.S., Kocsis, J.D., 2005. Integration of engrafted Schwann cells into injured peripheral nerve: axonal association and nodal formation on regenerated axons. *Neurosci. Let.* 387, 85-89.

Rodríguez, F.J., Valero-Cabré, A., Navarro, X., 2004. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug. Discov. Today* 1, 177-185.

Schröder, J.M., 1975. Degeneration and regeneration of myelinated nerve fibres in experimental neuropathies. In: Dyck, P.J., Thomas, P.K., Lambert, E.H. (Eds.), *Peripheral Neuropathy*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 337-362.

Skup, M., Dwornik, A., Macias, M., Sulejczak, D., Wiater, M., Czarkowska-Bauch, J., 2002. Long-term locomotor training up-regulates TrkB receptor-like proteins, brain-derived

neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord. *Exp. Neurol.* 176, 289-307.

Stone, L., Keenan, M.A.E., 1988. Peripheral nerve injuries in the adult with traumatic brain injury. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 233, 136-144.

Tomas, J., Santafé, M., Lanuza, M.A., Fenoll-Brunet, M.R., 1997. Physiological activity-dependent ultrastructural plasticity in normal adult rat neuromuscular junctions. *Biol. Cell* 89, 19-28.

Trojan, D.A., Collet, J.-P., Pollak, M.N., Shapiro, S., Jubelt, B., Miller, R.G., Agre, J.C., Munsat, T.L., Hollander, D., Tandan, R., Robinson, A., Finch, L., Ducruet, T., Cashman, N.R., 2001. Serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) does not correlate positively with isometric strength, fatigue, and quality of life in post-polio syndrome. *J. Neurol. Sci.* 182, 107-115.

Vallat, J.-M., Magy, L., 2005. Neuropathies périphériques: généralités. *EMC-Neurologie* 2, 175-181.

Van Meeteren, N.L.U., Brakkee, J.H., Hamers, F.P.T., Helders, P.J.M., Gispen, W.H., 1997. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after nerve crush lesion in the rat. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 78, 70-77.

Van Meeteren, N.L.U., Brakkee, J.H., Helders, P.J.M., Gispen, W.H., 1998. The effect of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 3, 277-282.

Varejão, A.S.P., Meek, M.F., Ferreira, A.J.A., Patrício, J.A.B., Cabrita, A.M.S., 2001. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in rat: walking track analysis. *J. Neurosci. Methods* 108, 1-9.

Vögelin, E., Baker, J.M., Gates, J., Dixit, V., Constantinescu, M.A., Jones, N.F., 2006. Effects of local continuous release of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp. Neurol.* 199, 348-353.

Wright, N.C., Kilmer, D.D., McCrory, M.A., Aitkens, S.G., Holcomb, B.J., Bernauer, E.M., 1996. Aerobic walking in slowly progressive neuromuscular disease: effect of a 12-week program. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 77, 64-69.

Ying, Z., Roy, R.R., Edgerton, V.R., Gómez-Pinilla, F., 2003. Voluntary exercise increase neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. *Brain Res.* 987, 93-99.

Fig. 1. Comparison of the functional recovery determined by sciatic functional index (SFI) before (pre-training) and after (post-training) 1, 2, 3 and 4 weeks of specific exercise physical training calculated from the free walking pattern of the sciatic nerve crushed rats. Graphs show comparisons between the SFI of the CON and SED groups (A), CON and ET groups (B), CON and RT groups (C), CON and CT groups (D), ET and RT groups (E), and ET and CT groups (F). The points of the curves represent the group mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Fig. 2. Photomicrographs of cross-semithin sections (1 μm) obtained from regenerating sciatic nerves after 5 weeks of specific exercise training. A and B – proximal and distal portions, respectively, from normal nerves of the CON group. Note the apparent bimodal fiber spectrum, the large and small myelinated fibers and the scanty space of endoneurial connective tissue between the myelinated fibers, when the clusters of unmyelinated fibers are present. C and D - proximal and distal portions, respectively, from regenerating nerves of the SED group. Note the small differences between the proximal portions of the SED and the CON groups; however the SED group shows an apparent unimodal fiber spectrum with the predominance of small diameter thin myelin sheath fibers at the distal portion. Moreover, note the increase in endoneurial connective tissue between the nerve fibers and the presence of degeneration debris at this portion. E and F - proximal and distal portions, respectively, from regenerating nerves of the ET group. Note the small differences between the proximal portions of the ET and the CON groups. At the distal portion, myelinated fibers appear to be similar to the CON group; moreover, the increase in endoneurial connective tissue between the myelinated fibers and the presence of degeneration debris seems to be smaller than in the SED group. G and H - proximal and distal portions, respectively, from regenerating nerves of the RT group. I and J - proximal and distal portions, respectively, from regenerating nerves of

the CT group. The proximal portions of the RT and CT groups appear to be similar to the other groups. Nevertheless, note the differences between the distal portions of the RT and CT groups when compared to those of the CON and ET groups, and their similarity to that of the SED group. Mf, myelinated nerve fiber; Uf, unmyelinated nerve fiber; Sc, Schwann cell; *, endoneurial connective tissue; Dd, degeneration debris; BV, blood vessel. Sections were stained with toluidine blue. Scale bar = 20 μ m.

Fig. 3. Effects of specific physical exercise training on the morphometric parameters of regenerating right sciatic nerve fibers. Graphics show the density of myelinated fibers at the proximal (A) and distal (B) portions of the nerves; the average myelinated fiber area at the proximal (C) and distal (D) portions of the nerves; and, the average myelin sheath thickness at the proximal (E) and distal (F) portions of the nerves. Data are expressed as means and SEM. Letter “a” corresponds to $p < 0.05$ when compared to the CON group, “b” to $p < 0.05$ when compared to the SED group and “c” to $p < 0.05$ when compared to the ET group.

Fig. 4. Effects of specific physical exercise training on morphometric parameters of regenerating right sciatic nerves. Graphics show the percentage area of myelinated fibers at the proximal (A) and distal (B) portions of the nerves; and the percentage area of endoneurial connective tissue at the proximal (C) and distal (D) portions of the nerves. Data are expressed as means and SEM. Letter “a” corresponds to $p < 0.05$ when compared to the CON group and “b” to $p < 0.05$ when compared to the SED group.

Figure 1

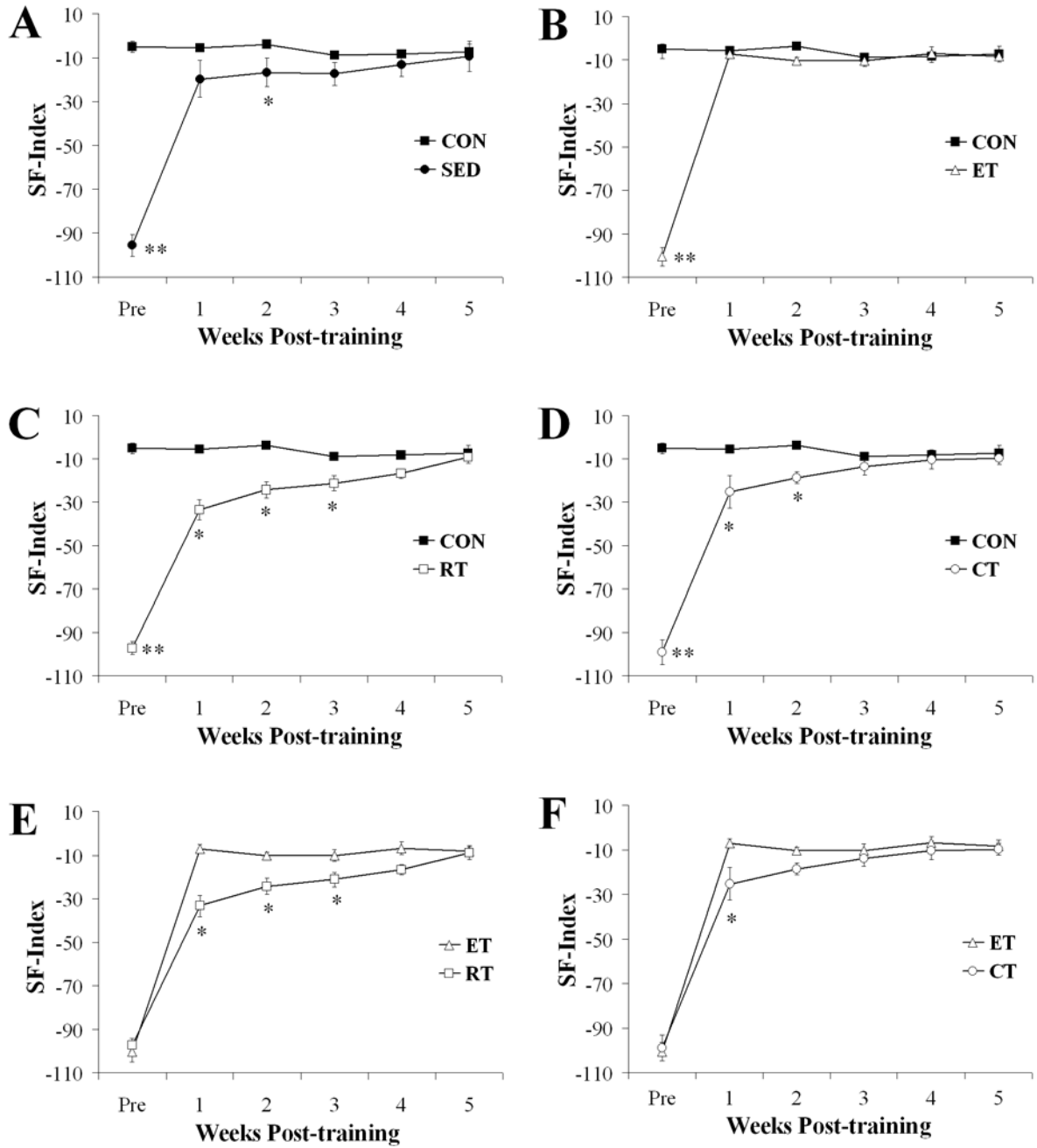


Figure 2

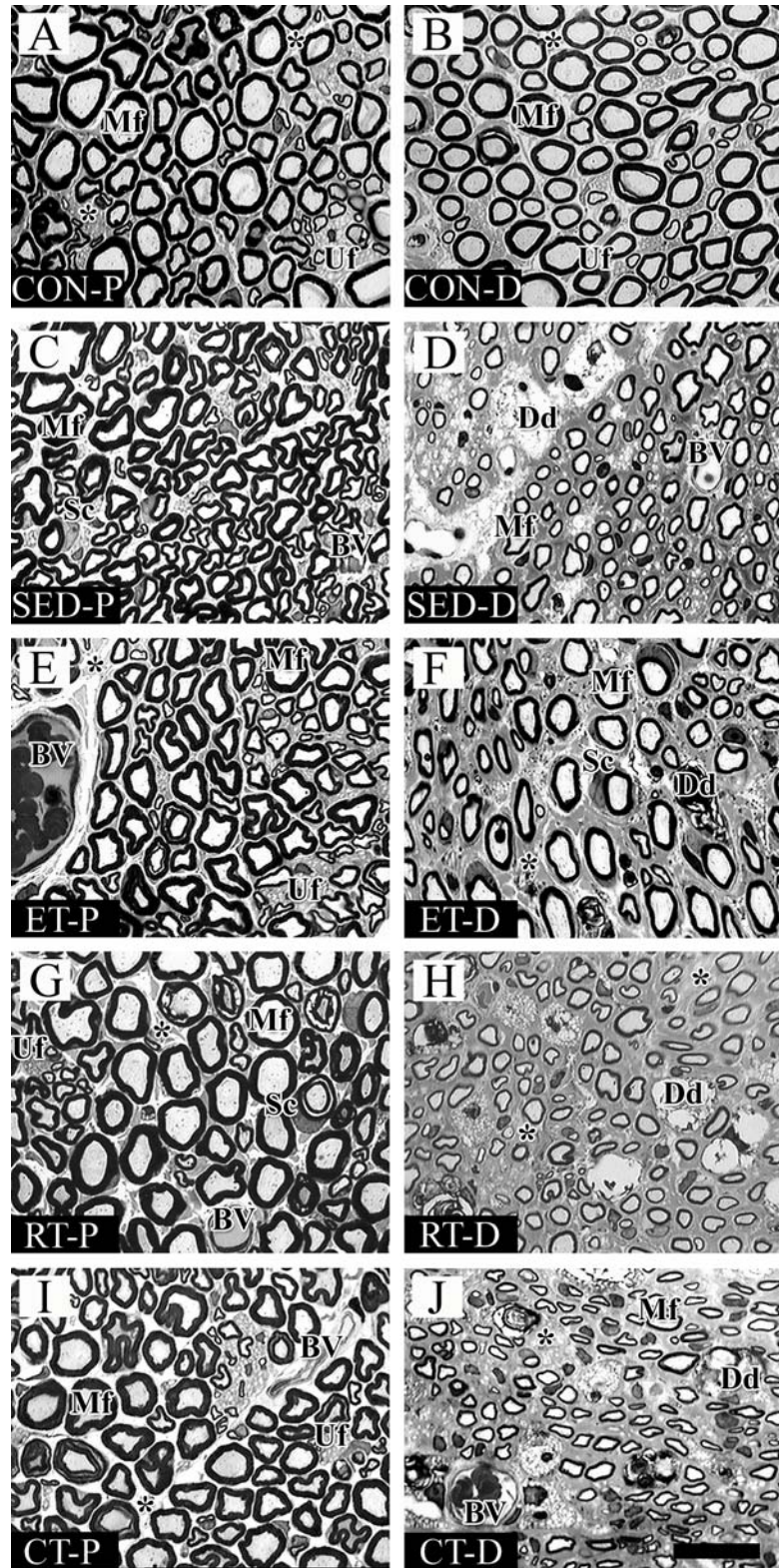


Figure 3

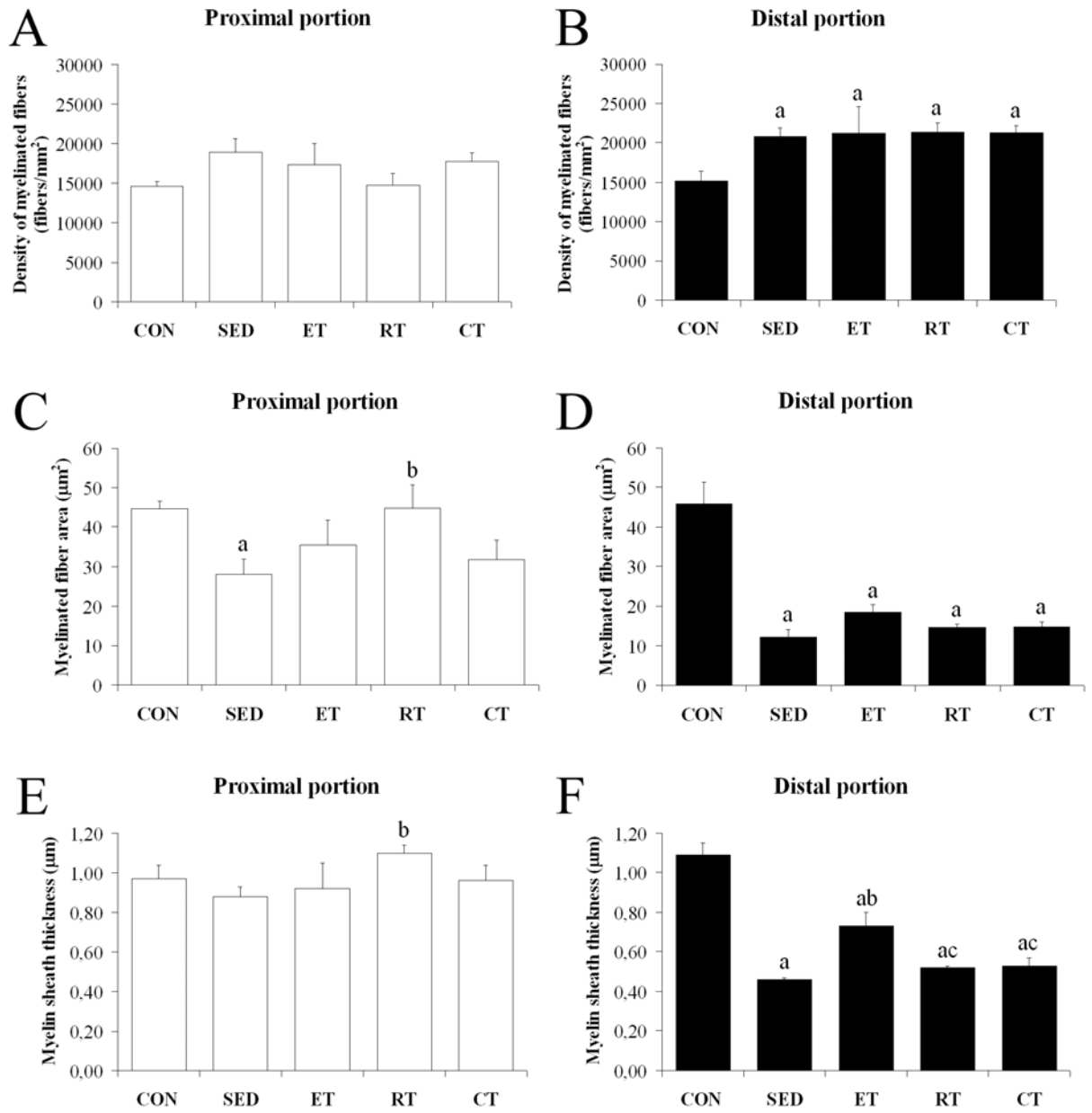
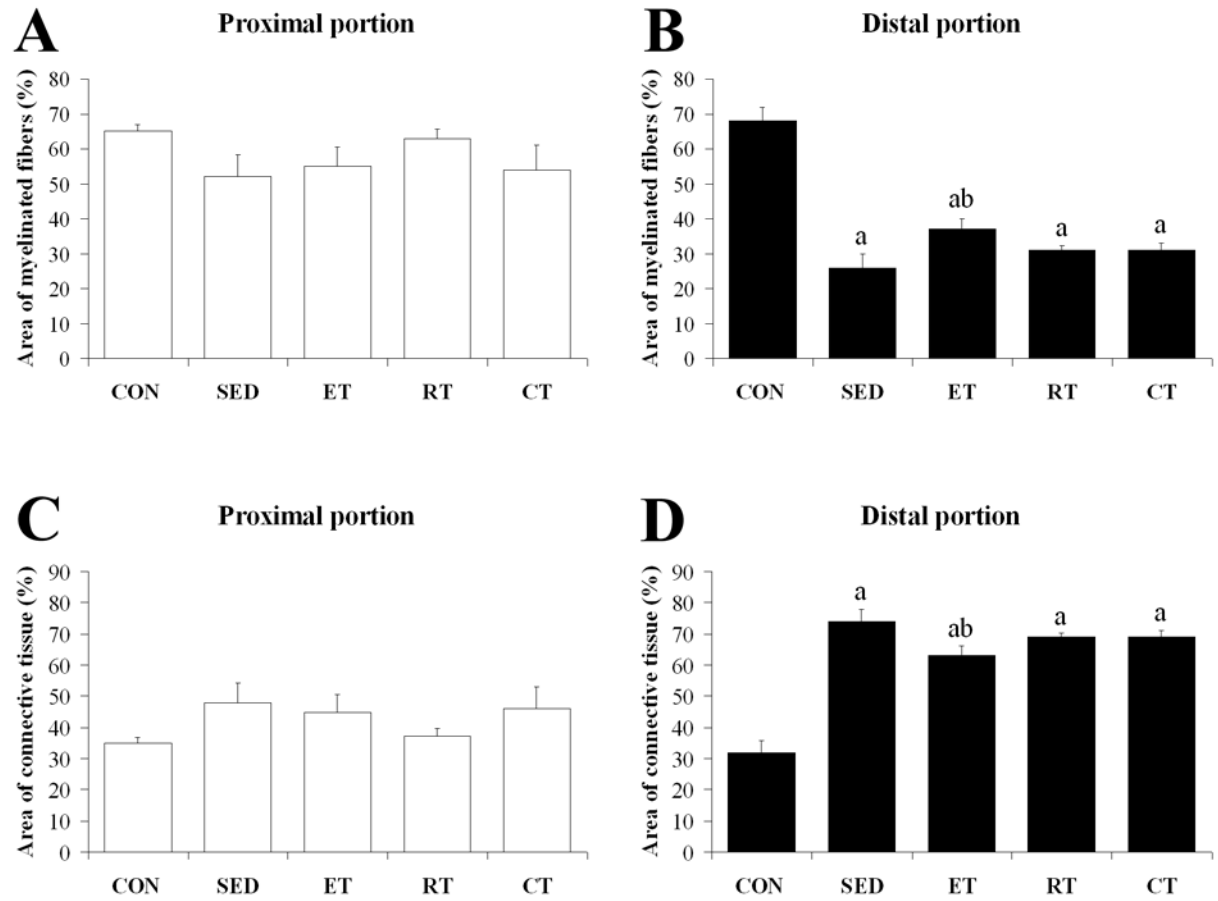


Figure 4



5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste estudo sugerem que um protocolo de exercício aeróbico moderado acelera a recuperação funcional e auxilia a regeneração nervosa periférica após lesão traumática experimental em ratos machos adultos.

Contraditoriamente, a realização somente de exercícios de resistência muscular, ou a combinação de exercícios de resistência e aeróbicos (treinamento concorrente), parece retardar a recuperação funcional, embora não tenha impedido nos animais que fizeram parte deste estudo. Além disso, estes treinamentos não auxiliaram a regeneração do nervo ciático lesionado.

A compreensão dos mecanismos pelos quais os exercícios físicos exercem suas influências sobre o sistema nervoso lesionado pode contribuir para o aprimoramento das terapias empregadas na reabilitação de pacientes acometidos por patologias neurológicas. Dentro deste contexto, os resultados encontrados neste estudo servem como referências para futuras pesquisas que busquem elucidar a relação entre lesões dos nervos periféricos e o padrão de expressão de fatores tróficos dependentes da atividade motora. Além disso, faz-se necessário estudar ainda, os efeitos da variação da intensidade dos protocolos utilizados e seus efeitos sobre a regeneração nervosa.

6 APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS

Jocemar Ilha, Rafaela T. Araujo, Tais Malysz, Leonardo Peyré-Tartaruga, Matilde Achaval, 2006. **Effects of the endurance and resistance training in the locomotion of rats after sciatic nerve crush.** In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Águas de Lindóia, Brasil.

Jocemar Ilha, Rafaela T. Araujo, Tais Malysz, Leonardo Peyré-Tartaruga, Matilde Achaval, 2006. **Effects of the endurance and resistance training in the locomotion of rats after sciatic nerve crush.** In: XXII Congresso Latinoamericano y 1^{ro} Iberoamericano de Ciências Fisiológicas. Buenos Aires, Argentina.

Jocemar Ilha, Rafaela T. Araujo, Tais Malysz, Paula Rigon, Erica Hermel, Léder Xavier, Matilde Achaval, 2006. **Endurance training enhances the sciatic nerve regeneration in rats.** In: XXII Congresso Latinoamericano y 1^{ro} Iberoamericano de Ciências Fisiológicas. Buenos Aires, Argentina.

Jocemar Ilha, Rafaela T. Araujo, Tais Malysz, Paula Rigon, Erica Hermel, Léder Xavier, Matilde Achaval, 2006. **Treinamento aeróbico acelera a regeneração do nervo ciático em ratos.** In: IV Oficina de Neurociências Fronteiras da Investigação. Garibaldi, Brasil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Armstrong, D.M. The supraspinal control of mammalian locomotion. *J. Physiol.*, 405: 1-37, 1988.

Bhatheja, K., Field, J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38: 1995-1999, 2006.

Bell, G.R., Rothman, R.H. The conservative treatment of sciatica. *Spine*, 9: 54-56, 1984.

Bioulac, B., Burbaud, P., Cazalets, J.-R., Gross, C. Fonctions motrices. *EMC-Neurologie*, 1: 277-329, 2004.

Bridge, P.M., Ball, D.J., Mackinnon, S.E., Nakao, Y., Brandt, K., Hunter, D.A., Hertl, C. Nerve crush injuries: a model for axonotmesis. *Exp. Neurol.*, 127: 284-290, 1994.

Crockett, J.L., Edgerton, V.R., Max, S.R., Barnard, R.J. The neuromuscular junctions in response to endurance training. *Exp. Neurol.*, 51: 207-215, 1976.

Dahlin, L.B., Brandt, J. Basic science of peripheral nerve repair: wallerian degeneration/growth cones. *Oper. Tech. Orthop.*, 14: 138-145, 2004.

De Medinaceli, L., Freed, W.J., Wyatt, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neurol.*, 77: 634-643, 1982.

De Medinaceli, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J. Neurosci. Methods*, 58: 29-37, 1995.

Deschenes, M.R., Judelson, D.A., Kramer, W.J., Meskaitis, V.J., Volek, J.S., Nindl, B.C., Harman, F.S., Deaver, D.R. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. *Muscle Nerve*, 23: 1576-1581, 2000.

Dietz, V. Spinal cord pattern generators for locomotion. *Clin. Neurophysiol.*, 114: 1379-1389, 2003.

Duysens, J., Van de Crommert, H.W.A. Neural control of locomotion; part 1: the central pattern generator from cats to humans. *Gait Posture*, 7: 131-141, 1998.

Eisen, A.A., Carpenter, S., Karpati, G., Bellavance, A. The effect of muscle hyper- and hypoactivity upon fibre diameters of intact and regenerating nerves. *J. Neurol. Sci.*, 20: 457-469, 1973.

England, J.D., Asbury, A.K. Peripheral neuropathy. *Lancet*, 363: 2151-2161, 2004.

Fletcher, T.F. Nervous tissue. In: Dellmann, H.D., Eurell, J.A. (eds), *Textbook of veterinary histology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 91-113, 1998.

Fredericks, C.M. Disorders of the peripheral nervous system: the peripheral neuropathies. In: Fredericks, C.M., Saladin, L.K. (eds), *Pathophysiology of the motor systems: principles and clinical presentations*. F.A. Davis Company, Philadelphia, pp. 346-372, 1996.

Gasc, J-P. Comparative aspects of gait, scaling and mechanics in mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131: 121-133, 2001.

Gordon, T., Sulaiman, O., Boyd, J.G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J. Peripher. Nerv. Syst.*, 8: 236-250, 2003.

Grafstein, B. The nerve cell body response to axotomy. *Exp. Neurol.*, 48: 32-51, 1975.

Grillner, S. Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates. *Science*, 228: 143-147, 1985.

Grillner, S., Wallén, P. Cellular bases of a vertebrate locomotor system – steering, intersegmental and segmental co-ordination and sensory control. *Brain Res. Rev.*, 40: 92-106, 2002.

Gutmann, E., Jakoubek, B. Effect of increased motor activity on regeneration of the peripheral nerve in young rats. *Physiol. Bohemoslov.*, 12: 463-468, 1963.

Herbison, G.J., Jaweed, M.M., Diturno, J.F. Exercise therapies in peripheral neuropathies. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 64: 201-205, 1983.

Ide, C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res.*, 25: 101-121, 1996.

Ilha, J., Peyré-Tartaruga, L.A., Araujo, R.T., Metsen, F., Malysz, T., Canto, F., Achaval, M., Loss, J.F. Locomotor behaviour assessment in the rat by kinematic analysis. *J. Biomech.*, 39: S507, 2006.

Irintchev, A., Carmody, J., Wernig, A. Effects on recovery of soleus and extensor digitorum longus muscle of prolonged wheel running during a period of repeated nerve damage. *Neurosci.*, 44: 515-519, 1991.

Jaweed, M.M., Herbison, G.J., Diturtno, J.F. Effect of swimming on compensatory hypertrophy of reinnervating soleus and plantaris muscle. *Am. J. Phys. Med.*, 53: 35-40, 1974.

Kartje, G.L., Schwab, M.E. Axonal growth in the adult mammalian nervous system: regeneration and compensatory plasticity. In: Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T., Price, D.L. (eds.), *Basic Neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 517-527, 2006.

Lee, S., Barton, E.R., Sweeney, H.L., Farrar, R.P. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J. Appl. Physiol.*, 96: 1097-1104, 2004.

Linderman, E., Leffers, P., Spaans, F., Drukker, J., Reulen, J., Kerckhoffs, M., Köke, A. Strength training in patients with myotonic dystrophy and hereditary motor and sensory neuropathy: a randomized clinical trial. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 76: 612-620, 1995.

Matsuura, T., Ikata, T., Takata, S., Kashiwaguchi, S., Niwa, M., Sogabe, T., Koga, K. Effect of weight bearing on recovery from nerve injury in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 91: 2334-2341, 2001.

Mackinnon, S.E., Hudson, A.R., Hunter, D.A. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast. Reconstr. Surg.*, 75: 384-388, 1985.

Martyn, C.N., Hughes, R.A.C. Epidemiology of peripheral neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, 62: 310-318, 1997.

Radtke, C., Akiyama, Y., Lankford, K.L., Vogt, P.M., Krause, D.S., Kocsis, J.D. Integration of engrafted Schwann cells into injured peripheral nerve: axonal association and nodal formation on regenerated axons. *Neurosci. Letter*, 387: 85-89, 2005.

Ramón y Cajal, S. *Ciência y arte*. E. Obra Social, Madrid, 2003.

Reier, P.J. Degeneration and regeneration in the nervous system. In: Conn, P.M. (ed), *Neuroscience in medicine*. L.B. Lippincott Company, Philadelphia, pp. 593-619, 1995.

Rodríguez, F.J., Valero-Cabré, A., Navarro, X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discov. Today*, 1: 177-185, 2004.

Schröder, J.M. Degeneration and regeneration of myelinated nerve fibres in experimental neuropathies. In: Dyck, P.J., Thomas, P.K., Lambert, E.H. (eds.), *Peripheral neuropathy*, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 337-362, 1975.

Son, Y., Trachtenberg, J.T., Thompson, W.J. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci.*, 19: 280-285, 1996.

Thomas, P.K., Landon, D.N., King, R.H.M. Disease of the peripheral nerves. In: Graham, D.I., Lantos, P.L. (eds), *Greenfield's neuropathology*. Licensing Agency, London, pp 367-487, 1997.

Tomas, J., Santafé, M., Lanuza, M.A., Fenoll-Brunet, M.R. Physiological activity-dependent ultrastructural plasticity in normal adult rat neuromuscular junctions. *Biol. Cell*, 89: 19-28, 1997.

Tonge, D.A., Golding, J.P. Regeneration and repair of the peripheral nervous system. *Semin. Neurosci.*, 5: 385-390, 1993.

Tresch, M.C., Saltiel, P., d'Avella, A., Bizzi, E. Coordination and localization in spinal motor systems. *Brain Res. Rev.*, 40: 66-79, 2002.

Vallat, J.-M., Magy, L. Neuropathies périphériques: généralités. *EMC-Neurologie*, 2: 175-181, 2005.

Van Meeteren, N.L.U., Brakkee, J.H., Hamers, F.P.T., Helders, P.J.M., Gispen, W.H. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after nerve crush lesion in the rat. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 78: 70-77, 1997.

Van Meeteren, N.L.U., Brakkee, J.H., Helders, P.J.M., Gispen, W.H. The effect of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J. Peripher. Nerv. Syst.*, 3: 277-282, 1998.

Vroomen, P.C., de Krom, M.C., Slofstra, P.D., Knottnerus, J.A. Conservative treatment of sciatic: a systematic review. *J. Spinal Disord.*, 13: 463-469, 2000.

Williams, P.L. *Gray's anatomy: The anatomical basis of medicine and surgery*. Licensing Agency, London, 1995.

Wright, N.C., Kilmer, D.D., McCrory, M.A., Aitkens, S.G., Holcomb, B.J., Bernauer, E.M. Aerobic walking in slowly progressive neuromuscular disease: effect of a 12-week program. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 77: 64-69, 1996.