



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

**LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA E ENVELHECIMENTO:
EFEITOS DO TREINAMENTO EM ESTEIRA**

Dissertação de Mestrado

Núbia Broetto Cunha

Porto Alegre

2010

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

**LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA E ENVELHECIMENTO:
EFEITOS DO TREINAMENTO EM ESTEIRA**

Núbia Broetto Cunha

Orientadora
Prof^ª. Dr^ª. Matilde Achaval Elena

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

2010

RESUMO

O treinamento em esteira tem sido utilizado como recurso terapêutico após a aplicação de modelos de lesão nervosa periférica, sendo considerada uma intervenção eficaz para a aceleração do processo de regeneração nervosa (ILHA et al., 2008; SABATIER et al., 2008). Em contrapartida o processo de envelhecimento pode ser um fator capaz de retardar a regeneração do nervo periférico após lesão (BOWE et al., 1987; POLA et al., 2004). Nesse contexto, o presente estudo verificou os possíveis efeitos do treinamento em esteira sobre a regeneração nervosa periférica após esmagamento do nervo ciático de ratos jovens (3 meses de idade) e maduros (13 meses de idade), utilizando análises funcional, eletrofisiológica e morfométrica. Os resultados demonstram que o treinamento em esteira melhorou a função sensoriomotora e aumentou a amplitude do potencial de ação do músculo gastrocnêmio nos animais jovens. A análise morfológica mostrou um aumento da densidade de fibras mielínicas no grupo jovem submetido à lesão, caracterizando uma reposta de poli-inervação, que foi reduzido após a aplicação do treinamento em esteira. Essa redução pode sugerir uma melhora na funcionalidade das unidades motoras após o exercício. No grupo maduro, o treinamento em esteira promoveu melhora somente na função sensoriomotora, sendo que não houve diferenças significativas nos parâmetros eletrofisiológicos e morfométricos. Futuros estudos são necessários para investigar se um maior período de treinamento nos ratos maduros é capaz de promover melhora nos parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos, além da investigação da influência da associação do treinamento em esteira em ratos maduros com outros recursos terapêuticos como é encontrado na reabilitação de pacientes com neuropatia periférica na prática clínica.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Lesão e regeneração nervosa periférica.....	2
1.2 Modelo animal.....	8
1.3 Envelhecimento.....	9
1.4 Exercício físico e neuropatias periféricas.....	11
2 JUSTIFICATIVA.....	14
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 MÉTODOS E RESULTADOS.....	16
4.1 Artigo – Núbia Broetto Cunha, Jocemar Ilha, Lígia A. Centenaro, Gisele A. Lovatel, Luciane F. Balbinot, Matilde Achaval. Effects of treadmill training on the aging process after traumatic peripheral nerve lesion in rats.....	16
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF.....Fator neurotrófico derivado do encéfalo

GAP.....Proteína associada ao crescimento

LNP.....Lesão nervosa periférica

N-CAM.....Molécula neural de adesão celular

NGF.....Fator de crescimento neural

NPs.....Nervos periféricos

SNC.....Sistema nervoso central

SNP.....Sistema nervoso periférico

TrKA.....Receptor tirosino-quinase A

TrKB.....Receptor tirosino-quinase B

TrKC.....Receptor tirosino-quinase C

ARTIGO

BDNF.....Brain-derived neurotrophic factor

ConM.....Control mature

ConY.....Control Young

HLRWT...Horizontal ladder rung walking test

InM.....Injured mature

InY.....Injured Young

MET.....Maximal exercise test

NBT.....Narrow beam test

PNL.....Peripheral nerve lesion

TrM.....Trained mature

TrY.....Trained young

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de degeneração e regeneração no SNP.....	4
Figura 2. Processo de degeneração walleriana no SNP.....	6
Figura 3. Representação esquemática da idade dos animais associada às modificações ocasionadas no processo de envelhecimento.....	11

ARTIGO

Figure 1. Distribution of the needle electrodes during the electrophysiological test.....	38
Figure 2. Comparison of the sensorimotor analysis determined by horizontal ladder rung walking test and narrow beam test on the young and mature rats.....	38
Figure 3. Analysis of treadmill training on the muscular evoked potential on the young and mature rats.....	39

Figure 4. Digitalized images of transverse-semithin sections (1 μm) obtained from regenerating sciatic nerves after 5 weeks of treadmill training.....39

Figure 5. Effects of treadmill training on the morphometrical parameters of regenerating right sciatic nerve fibers.....40

Figure 6. Effects of treadmill training on the morphometrical parameters of regenerating right sciatic nerve.....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela esquemática dos tipos e características da neuroplasticidade.....	8
--	---

1 INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos são alvos frequentes de lesões traumáticas, tais como, esmagamento, compressão, estiramento, avulsão e secção parcial ou total, que resultam na interrupção da transmissão correta de impulsos nervosos e diminuição ou perda da sensibilidade e motricidade no território inervado. Em pacientes, a recuperação morfológica e funcional após uma lesão nervosa raramente é completa, apesar da aplicação de técnicas modernas e sofisticadas de reconstrução. Esse fato deve-se a inúmeros fatores que influenciam na regeneração da fibra nervosa, incluindo a natureza e o nível da lesão, o tempo de desnervação, o tipo e diâmetro das fibras nervosas afetadas, a idade do indivíduo e outras variáveis individuais (MONTE RASO et al., 2005).

A plasticidade neuromuscular é a base do controle neural do movimento, pois dentro da variação normal da função, o controle de movimento depende da resposta contínua do sistema nervoso às informações que recebe a respeito do estado do organismo e do meio ambiente. Entretanto, muitas vezes essa plasticidade é ampliada de modo que a função neuromuscular possa adaptar-se a circunstâncias externas distintas, como um treinamento muscular intensivo ou frente a uma lesão de nervo periférico (LOWRIE, 2000).

Durante o processo de reinervação existe uma retração seletiva de ramos axonais colaterais mal direcionados durante semanas subseqüentes a reinervação muscular (LOWRIE, 2000). Logo, a ausência de atividade contrátil em fibras musculares desnervadas pode estimular a persistência deste brotamento axonal colateral mal direcionado. Assim, a atividade física pode, ao menos em parte, influenciar na retração

seletiva dos ramos axonais colaterais de maneira a regular a plasticidade neuromuscular durante o período de reinervação (SON & THOMPSON, 1995).

1.1 Lesão e Regeneração Nervosa Periférica

Diversos tipos de lesões podem acometer o nervo periférico. Seddon (1943) as classificou conforme o grau de lesão dos componentes neurais em: neuropraxia, axonotmese e neurotmese.

Neuropraxia – é a forma mais branda de uma lesão nervosa, na qual existe um bloqueio localizado na condução dos estímulos nervosos, que, no entanto, está preservada nos segmentos proximal e distal a lesão. Nessa lesão, o axônio não perde sua continuidade, portanto ocorre uma recuperação rápida e completa em poucas semanas.

Axonotmese – é uma lesão mais grave, na qual os danos são suficientes para promover uma ruptura da continuidade axonal, provocando uma degeneração walleriana. O prognóstico de recuperação funcional é bom, desde que seja mantida a continuidade do tecido conjuntivo de suporte e a integridade das células de Schwann e da membrana basal.

Neurotmese – é o tipo mais grave de lesão nervosa periférica. Nela há uma completa ruptura do nervo periférico e o prognóstico de recuperação não é favorável, a menos que a continuidade do nervo seja restabelecida.

As desordens mais comuns dos nervos periféricos (NPs) são aquelas que afetam primariamente o axônio, chamadas axonopatias. Estas são frequentemente causadas por traumas agudos, sendo assim o esmagamento pode ser ocasionado por

compressão, contusões traumáticas, ou secção por artefatos penetrantes (FREDERICKS, 1996).

Frequentemente os sinais e sintomas observados nos pacientes acometidos por uma neuropatia periférica incluem dor lombar, dor ao longo do nervo ciático, distúrbios sensoriais e fraqueza dos músculos do membro inferior inervados por ele (KOBAYASHI; YOSHIZAWA; YAMADA, 2004).

Ao ocorrer uma lesão nervosa periférica (LNP), inicia-se uma série de reações nos neurônios sensoriais e motores, principalmente no soma celular, no local da lesão e distal a ela (Figura 1). O processo que ocorre no soma neuronal é chamado cromatólise e tem início dentro das primeiras horas após a lesão. Sucede-se pela vacuolização 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 (REIER, 1995; KARTJE & SCHWAB, 2006). A característica mais marcante da cromatólise é a dissolução dos grânulos de Nissl, além disso, há o rompimento do aparelho de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso, com um concomitante aumento na densidade de poliribossomos livres no citoplasma (REIER, 1995).

O axônio desconectado do soma neuronal tem seu segmento distal gradualmente degenerado, caracterizando a degeneração walleriana. Esta degeneração serve para criar um microambiente favorável ao novo crescimento axonal (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004) e é uma etapa essencial na regeneração de axônios lesionados (ZHANG et al., 2000). O processo de regeneração é facilitado por um ambiente favorável na periferia (STOLL & MULLER, 1999), porém alguns fatores podem impedir o retorno normal da função, como a distância entre os

cotos do nervo (GORDON; SULAIMAN; BOYD, 2003), distúrbios metabólicos (KENNEDY & ZOCHODNE, 2005), o tipo de lesão e a idade (RUITER et al., 2008).

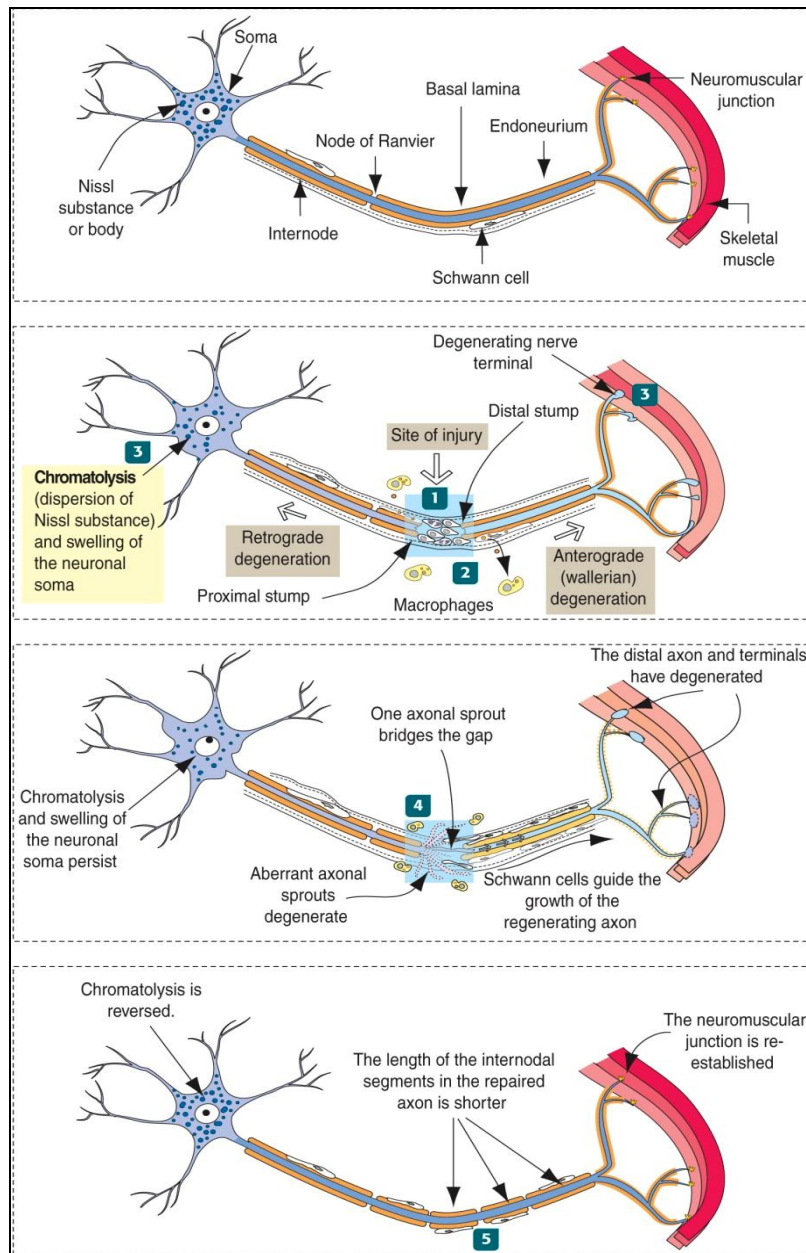


Figura 1. Processo de degeneração e de regeneração no SNP. Após uma lesão axonal por esmagamento, as células de Schwann sofrem divisão mitótica e preenchem o espaço entre os cotos proximais e distais do nervo (1). Estas células fagocitam a mielina. Gotículas de mielina são excretadas por estas células de Schwann e, em seguida, fagocitadas pelos macrófagos (2). Ocorre cromatólise (3) e é observada a degeneração dos segmentos distal e proximal do axônio. O coto proximal do axônio gera múltiplos brotamentos que avançam por entre as células de Schwann, e estes brotamentos persistem e crescem distalmente para reinervar o músculo (4). Uma vez o axônio regenerado atinge o órgão-alvo, as células de Schwann começam a produzir mielina (5) (modificado de KIERSZENBAUM, 2008).

Logo após a desconexão dos segmentos proximal e distal, os mesmos se retraem, o axoplasma 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 (Figura 2), dentro da lamina basal das fibras degeneradas (IDE, 1996; DAHLIN & BRANDT, 2004). Essas são essenciais para a regeneração nervosa, uma vez que provém um ambiente permissivo para o crescimento do axônio, sendo também fonte de fatores neurotróficos (SON; TRACHTENBERG; THOMPSON, 1996; RADTKE et al., 2005; KARTJE & SCHWAB, 2006).

Além disso, 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 & SCHWAB, 2006). Estes se estendem através do espaço entre a lâmina basal e a membrana das células de Schwann ou a 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).

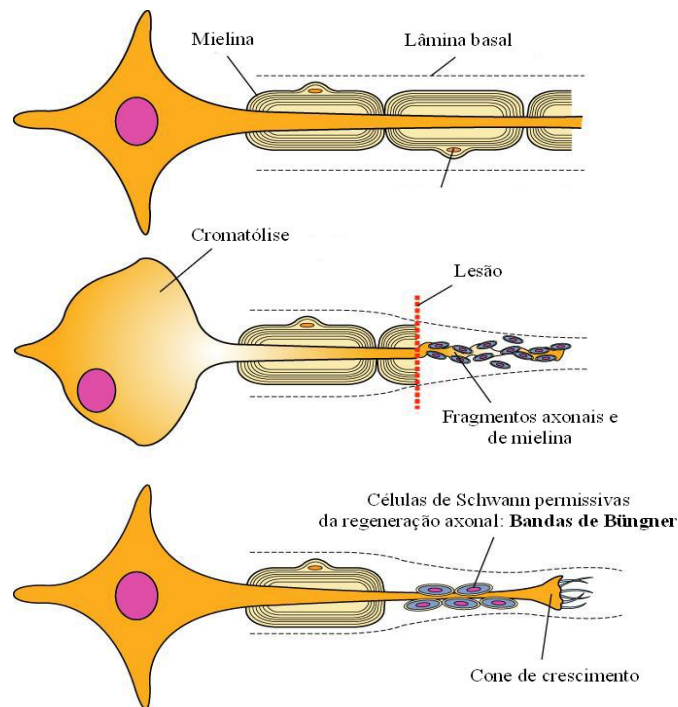


Figura 2. Processo de degeneração walleriana no SNP. Após uma lesão axonal, o corpo neuronal inicia um processo chamado cromatólise, caracterizado pelo aumento de volume (edema) e posição excêntrica do núcleo. Tão logo a lesão ocorra, o axônio e a mielina localizados distalmente ao corpo neuronal degeneram. Células de Schwann permissivas ao crescimento secretam fatores que estimulam os axônios a sobreviver e regenerar (modificado de KARTJE & SCHWAB, 2006).

Os cones de crescimento axonal 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 é 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 (IDE, 1996; DAHLIN & BRANDT, 2004).

Neurônios axotomizados devem passar de um modo de transmissão para um modo de crescimento, e expressar proteínas associadas ao crescimento, como GAP-43, tubulina e actina, bem como uma nova matriz de neuropeptídios e citocinas. Auxiliando desta maneira a promover a regeneração axonal (FU & GORDON, 1995).

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 (IDE, 1996; DAHLIN & BRANDT, 2004).

O grau de capacidade de adaptação do sistema nervoso ou neuroplasticidade varia de acordo com a idade (Tabela 1). Durante o desenvolvimento ontogenético, o sistema nervoso é mais plástico, sendo suscetíveis as informações do genoma e as influências do ambiente externo. Depois que o organismo ultrapassa essa fase e atinge a maturidade, sua capacidade plástica diminui, ou pelo menos se modifica. Além disso, em alguns casos é possível identificar mudanças morfológicas resultantes das alterações ambientais, chamadas de plasticidade morfológica, na qual há novos neurônios gerados em uma dada região, ou neurônios desaparecem por morte celular programada; são também novos circuitos neurais que se formam pela alteração do trajeto de fibras

nervosas, uma nova configuração da árvore dendrítica do neurônio, ou modificações no número e na forma das sinapses e dos espinhos dendríticos. No entanto, em alguns casos só é possível identificar correlatos funcionais, chamada de plasticidade funcional, geralmente ligada à atividade sináptica de um determinado circuito ou um determinado grupo de neurônios (LENT, 2010).

<i>Segundo a Idade</i>	<i>Segundo a Manifestação</i>	<i>Segundo o Alvo</i>	<i>Segundo o Fenômeno Observado</i>
Plasticidade ontogenética	Morfológica	Somática	Neurogênese, morte celular programada
		Axônica	Regeneração de fibras lesadas
			Brotamento de fibras íntegras
			Regulação da mielinação
		Dendrítica	Ramificação dendrítica e brotamento de espinhas
	Sináptica	Sinaptogênese	
	Funcional	Neuronal	Parâmetros de atividade neuronal
		Sináptica	Fortalecimento e consolidação sináptica
Comportamental	---	Aprendizagem, memória	
Plasticidade adulta	Morfológica	Somática	Neurogênese, morte celular
		Axônica	Regeneração de fibras lesadas apenas no SNP
			Brotamento de fibras íntegras
		Dendrítica	Formação e desaparecimento de espinhas
	Sináptica	Formação de novas sinapses	
	Funcional	Sináptica	Habituação, sensibilização, LTP, LTD, e outras
	Comportamental	---	Aprendizagem, memória

Tabela 1. Tipos e características da neuroplasticidade (LENT, 2010).

1.2 Modelo animal

Para mimetizar os efeitos observados após a LNP, bem como os fatores e estratégias terapêuticas que influenciam na recuperação da mesma, vários modelos animais têm sido utilizados. O ciático é o nervo mais utilizado nos estudos de regeneração do nervo periférico, pois possui um tronco nervoso com um adequado comprimento e espaço para intervenção cirúrgica (VALERO-CABRÉ & NAVARRO, 2002; 2004). De Medinacelli, Freed e Wyatt (1982) estabeleceram que a lesão por

esmagamento é uma modalidade para o estudo de regeneração dos NPs, pois é do tipo axonotmese, na qual os danos são suficientes para seccionar o axônio, levando a degeneração walleriana, porém sua recuperação funcional é boa, graças a preservação dos tecidos de sustentação.

1.3 Envelhecimento

O envelhecimento é considerado um fenômeno natural associado com alterações estrutural e funcional das células e tecidos. Normalmente ele leva a uma série de mudanças no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP), incluindo perda de neurônios e oligodendrócitos e diminuição das conexões sinápticas. Nos nervos periféricos ocorre uma diminuição no número de fibras mielínicas, prejuízo da interação célula de Schwann versus axônio, divisão da bainha da mielina, mielina redundante e interrupção do nodo de Ranvier (SHOKOUHI et al., 2008). A glicoproteína P0 e a expressão do gene para a proteína básica de mielina também foram encontradas diminuídas no nervo ciático de ratos velhos (MELCANGI et al., 1998). Além dos déficits observados pelas alterações estrutural e funcional das células e tecidos com o envelhecimento, os mesmos podem ser acentuados pela LNP.

Vários estudos clínicos têm sugerido que a idade mais jovem está associada a um prognóstico mais favorável após a LNP (HESS et al., 2006) desta maneira, pesquisas experimentais buscam elucidar os atrasos da regeneração associados ao envelhecimento, os quais indicam que a degeneração walleriana seja mais lenta (KEREZOUDI & THOMAS, 1999). Choi e colaboradores (1995) demonstraram que na 4ª semana pós LNP, os animais com 10 meses de idade apresentaram atraso no reparo

nervoso quando comparados com animais de 2 meses de idade, este atraso contribuiu principalmente para estudar a degeneração walleriana em ratos velhos.

A capacidade das células de Schwann em produzir mielina pode ser também importante para a regeneração, sendo mais lenta em animais velhos. A produção de nova mielina pelas células de Schwann durante a regeneração é regulada pelos axônios (KEREZOUDI & THOMAS, 1999).

As mudanças no transporte axonal têm sido implicadas na redução da capacidade regenerativa e do rápido crescimento do cone axonal de animais velhos. Existem evidências suficientes que apoiam a noção que as principais formas de transporte axonal anterógrado exibem retardo em nervos de ratos velhos. Além disso, detecta-se um déficit na quantidade de material transportado, ou ainda, na responsividade trófica de neurônios motores lesionados. Essas anormalidades podem estar associadas com a capacidade alterada de regenerar axônios lesionados em animais idosos (ALBERGHINA et al., 1983; PIEHL et al., 1998).

Os macrófagos também estão implicados neste processo mais lento de regeneração durante o envelhecimento. Foi encontrado baixo número de fibras mielínicas regeneradas em ratos submetidos à supressão experimental de macrófagos, sugerindo que a insuficiência de macrófagos peri-endoneurais observados em nervos envelhecidos pode reduzir a capacidade regeneradora dos mesmos (KEREZOUDI & THOMAS, 1999).

Quanto aos estudos eletrofisiológicos do nervo, estes mostram que a velocidade de condução de fibras nervosas permanece inalterada (SATO; SATO; SUZUKI, 1985),

enquanto a latência do potencial evocado somatossensorial aumenta gradualmente com o avanço da idade (ZEKPA & DINSE, 1995).

Estudos que utilizam modelos animais de diferentes idades para analisar a influência do envelhecimento no processo de regeneração do sistema nervoso, concordam quanto a relação da idade dos animais com as modificações orgânicas observadas no envelhecimento (KANDA & HASHIZUME, 1998; COQ & XERRY, 2000; HESS et al., 2006). Desta maneira, pode-se classificar os animais em faixas etárias correspondentes ao avançar da idade; portanto, ratos com média de idade de 3 meses são considerados adultos jovens, enquanto ratos de 13 meses de idade são considerados maduros ou de meia-idade (Figura 4).

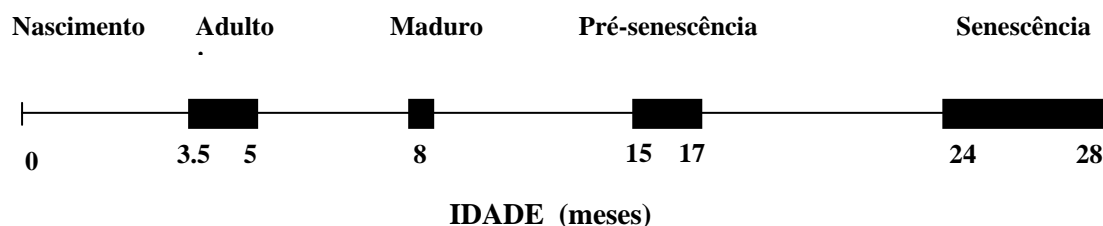


Fig. 4. Representação esquemática da idade relacionada às modificações encontradas com o processo do envelhecimento (modificado de COQ & XERRY, 2000).

1.4 Exercício físico e neuropatia periférica

Na prática clínica, diversas intervenções terapêuticas são empregadas após uma LNP, as quais buscam uma correta regeneração e recuperação da funcionalidade da região acometida. Em alguns casos, dependente do grau de lesão do nervo, o paciente é submetido ao procedimento cirúrgico e normalmente ao tratamento conservador, que pode incluir o repouso inicial e a prescrição de antiinflamatórios não esteróides,

analgésicos e corticóides por meio de infiltrações (RICARD, 2002). Ainda, se deve destacar o tratamento fisioterapêutico como: exercícios de condicionamento e força muscular, adaptações ergonômicas, orientações posturais, treinamento da flexibilidade e recursos eletroterapêuticos (COX, 2002). Embora os exercícios sejam bem empregados na prática clínica, ainda existem parâmetros não bem definidos e controvérsias entre os estudos no que concerne ao tipo de exercício, sua duração, seu início pós-lesão e a efetividade do mesmo com o processo de envelhecimento. Devido a essas questões, estudos experimentais têm buscado elucidar os efeitos do exercício físico, como por exemplo, o treinamento em esteira após LNP.

Os exercícios físicos diminuem as complicações comuns às patologias do SNP, tais como as contraturas e fraqueza dos músculos desnervados, auxiliando na recuperação funcional de pacientes com neuropatia periférica (LINDERMAN et al., 1995; WRIGHT et al., 1996). Além disso, o suporte do próprio peso corporal parece ser um fator importante na recuperação da função. Ratos com nervo ciático submetidos a compressão obtiveram ganho na tensão tetânica muscular e na recuperação funcional no grupo de animais que suportaram seu próprio peso do que quando comparado ao grupo de animais que tiveram suas patas posteriores suspensas (MATSUURA et al., 2001).

Em outro estudo experimental, ratos foram forçados a alcançar o bico de sua garrafa de água no topo de sua caixa moradia, desta maneira, realizando exercício com seus membros posteriores por 4 horas diárias, durante 24 dias após a lesão. Os animais obtiveram uma melhora no retorno da função sensoriomotora e da velocidade de condução motora do nervo na fase inicial da recuperação da LNP (VAN MEETEREN et al., 1997). Marqueste e colaboradores (2004) também corroboram com esse resultado

eletrofisiológico, os quais encontraram uma melhora da recuperação funcional sensorial através de registros eletrofisiológicos do nervo.

O treinamento em esteira tem demonstrado ser capaz de auxiliar na recuperação locomotora e regeneração quando comparado ao treinamento de força em modelos de lesão nervosa periférica (ILHA et al., 2008), além disso, o exercício em esteira é capaz de proteger os nervos periféricos por atenuar reações oxidativas, preservando as células de Schwann e a bainha de mielina das mudanças patológicas, as quais ocorrem durante o envelhecimento normal (SHOKOUHI et al., 2008).

Treinamento em esteira nas 2 primeiras semanas após LNP produz uma acentuada melhora na regeneração dos axônios motores sem aumentar a propensão desses axônios de serem conduzidos a alvos inapropriados de reinervação, que poderiam alterar a funcionalidade da região acometida (ENGLISH et al., 2009). Observou-se também forte evidência do envolvimento do treinamento em esteira com a melhora da regeneração axonal após a LNP, estando diretamente relacionado à intensidade e frequência com que o exercício é realizado, sendo que em menor frequência e maior intensidade, o exercício auxiliou no aumento do crescimento axonal, enquanto que em menor intensidade e maior frequência parece não ter tanto impacto no crescimento axonal (SABATIER et al., 2008).

Desta maneira, além da importância da especificidade do treinamento, período de início, entre outros parâmetros de suma relevância para a indicação do mesmo após uma LNP, é importante que estes parâmetros estejam associados a corroborar com a regeneração durante o processo de envelhecimento, para que a mesma ocorra de maneira benéfica e mais eficaz possível.

2 JUSTIFICATIVA

Vários estudos têm demonstrado que a idade mais jovem está associada com um prognóstico mais favorável após o dano de nervos periféricos (VERDÚ et al., 2000; HESS et al., 2006). Estas observações clínicas dependentes da idade são corroboradas por trabalhos em modelos animais que mostram que os animais mais velhos apresentaram capacidade de regeneração diminuída após esmagamento, transecção ou dano do sistema nervoso periférico (BOWE et al., 1987; POLA et al., 2004).

Clinicamente, há certa predominância de pacientes com maior idade que apresentam algum tipo de desabilidade devido a uma LNP. Apesar do treinamento em esteira ser utilizado em estudos experimentais prévios como ferramenta para auxiliar no processo de regeneração após a realização desse tipo de lesão em animais jovens (ILHA et al., 2008; SABATIER et al., 2008), é necessário avaliar o efeito da aplicação do exercício em esteira em animais maduros submetidos a diferentes modelos de LNP. Desta maneira faz-se necessário estudar os efeitos do treinamento em esteira na lesão nervosa periférica durante o processo de envelhecimento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo geral analisar o efeito do treinamento em esteira na regeneração nervosa periférica de ratos jovens e maduros submetidos ao modelo de lesão traumática experimental do nervo ciático.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a performance sensoriomotora dos animais submetidos à modelo de lesão por esmagamento do nervo ciático em ratos jovens e maduros, após treinamento em esteira.

- Analisar o efeito do treinamento em esteira no potencial evocado muscular em ratos jovens e maduros submetidos à modelo de lesão por esmagamento do nervo ciático em ratos de ambas as idades.

- Avaliar a regeneração do nervo ciático, utilizando uma análise morfométrica da densidade de fibras mielínicas, maturação das fibras mielínicas, porcentagem da área de fibras mielínicas e porcentagem da área de tecido conjuntivo endoneural, em ratos de diferentes idades submetidos ao modelo de esmagamento do nervo periférico após treinamento em esteira.

4 MÉTODOS E RESULTADOS

4.1 **Artigo** – Núbia Broetto Cunha, Jocemar Ilha, Lígia A. Centenaro, Gisele A. Lovatel, Luciane F. Balbinot, Matilde Achaval. **Effects of treadmill training on the aging process after traumatic peripheral nerve lesion in rats.**

The effects of treadmill training on the aging process after traumatic peripheral nerve lesion in rats

Núbia Broetto Cunha^{a,b*}, Jocemar Ilha^{a,b}, Lígia Aline Centenaro^{a,b}, Gisele Agustini Lovatel^{a,b}, Luciane Fachin Balbinot^{a,b}, Matilde Achaval^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^bLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Running Title: Exercise on Sciatic Nerve Regeneration

Address correspondence to Matilde Achaval, MD, PhD, 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.
Phone Number: 55 51 33083624. E-mail: achaval@ufrgs.br.

Abstract

Treadmill training has been widely used as a therapeutic resource following peripheral nerve injury. Although this technique has been shown to have a beneficial impact on nerve regeneration, it is well known that the aging process can delay these positive results. In this context, few studies have attempted to investigate the influence of treadmill training on peripheral nerve regeneration during the aging process. In the present study, a 5-week treadmill training program was employed 1 week after a sciatic nerve crush, in order to investigate the possible effects on regeneration in young (3 months old) and mature rats (13 months old), using functional, electrophysiological, and morphometrical analyses. After 5 weeks training, sensorimotor function was improved in both young and mature groups, while muscle action potential amplitude was only greater in the young group. The training program reduced myelinated fiber density in the young group, which appeared to increase after nerve injury (poly-innervation), but decreased with training, which means that the innervation became more functional. The data indicate that treadmill training is capable of promoting functional, electrophysiological and morphological recovery in young animals. However, in mature animals, improvement was only seen in terms of functional recovery. Further investigations are necessary in order to test whether observable improvements occur following a longer training program and if the association of other therapies with treadmill training, as observed in clinical practice, is able to accelerate recovery in aging patients with peripheral neuropathies.

Key Words: Sciatic nerve crush; Peripheral nerve regeneration; Treadmill training; Aging; Sensorimotor evaluations, Electrophysiological analysis, Stereological analysis.

Introduction

Peripheral nerves are often subject to traumatic injury, resulting in interruption of correct nerve transmission, causing a decrease or loss of nerve sensitivity and motricity in the innervated region.¹ Regeneration following peripheral nerve injury may be influenced by various factors such as type of injury, location of the injury, time lapse between the injury and the surgical procedure, and the age of the patient.^{2,3}

Following peripheral nerve injury, favorable prognosis is more often seen in younger patients.⁴ These age-dependent results are based on clinical observations and supported by experimental investigations with animals, which also suggest a decrease in regeneration capacity after crush, transection or other peripheral nerve damage in older subjects.^{5,6} For example, the regenerative potential of peripheral nerve was compared in rats aged from 2, 8 and 17 months, with greater recovery being found in the 2-month-old animals. These age-related differences in the regenerative process can be explained by the lower speed and intensity of axonal growth that occurs with aging.⁷

Several experimental studies into the mechanisms involved in regeneration have investigated the role of physical exercise therapy in nerve injury rehabilitation. In rats with sciatic nerve traumatic injury, endurance training improves the degree of myelinated fiber maturation, reduces the area of endoneurial connective tissue and increases the area of myelinated fibers.⁸ Rats with sciatic nerve crush forced to exercise by stretching maximally to reach the teat of a bottle suspended from the top of a plexiglass box had greater functional recovery and motor nerve conduction speed.⁹

The elderly are more affected by nerve injuries and functional recovery is more difficult. As far as we know, there are no findings on the influence of physical exercise, such as treadmill training, on regeneration after peripheral nerve injury in individuals

undergoing the aging process. The aim this study was evaluate the therapeutic potential of treadmill training in sciatic nerve crush injury in young and mature rats using sensorimotor evaluation, muscle evoked potential and morphological nerve analysis.

Materials and methods

Experimental design and surgical procedures

The experiment was performed on male Wistar rats at 2 different ages: 3 months and 13 months (age at the start of the experiment), 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, and in compliance with the National Institute of Health's Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals (publication nr. 85-23, revised 1985), properly approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (nr. 2008193).

In the first step of the procedure, the animals were randomly divided in six groups: (1) young untrained rats without sciatic crush (YCon, n = 8); (2) young untrained rats with sciatic crush (YIn, n = 7); (3) young treadmill trained rats with sciatic crush (YTr, n = 7); (4) mature untrained rats without sciatic crush (MCon, n = 8); (5) mature untrained rats with sciatic crush (MIn, n=8); (6) mature treadmill trained rats with sciatic crush (MTr, n=8). Thereafter, animals were anesthetized using sodium

thiopental (40 mg/kg, i.p.; Cristalia, Brazil) and the right sciatic nerve was crushed with 1 mm hemostatic forceps for 30 seconds.¹⁰ The animals in the YCon and MCon groups, constituting the sham group, were submitted to sciatic nerve exposure, as were the lesion groups, but they were not submitted to nerve crush.

Three days later, all animals underwent a 4-day treadmill training adaptation program consisting of 10 minutes at 5 m/min. On the fifth day they were submitted to a Maximal Exercise Test (MET).¹¹ The test consisted of a graded exercise on the treadmill, with speed increments of 5m/min every 3 minutes, starting at 5 m/min and continuing up to the maximal intensity of each rat. The values attained in the MET were used to plan the treadmill training program, which started 1 week after the sciatic nerve crush.

Treadmill training

The treadmill training program was performed on a treadmill designed for humans (Runner, Brazil) and modified for use by rats.⁸ This training program consisted of running on a treadmill for 20 min on the first day with progressive increases every day, reaching 60 min on the 7th day, which was maintained for the next 4 weeks. Each training session included a warm-up period of 5 minutes running at 30% of the maximal speed reached in the MET, 10 to 50 min running at 45 to 50% and 5 min recovery at 30% again, 5 sessions per week, once a day, during 5 weeks.¹² This training program was considered a moderate-intensity endurance regime, because the animals ran for a long time at 45% to 55% of the maximal speed reached in their MET.

Sensorimotor evaluations

The horizontal ladder rung walking test (HLRWT) and the narrow beam test (NBT) were used to examine hindlimb sensorimotor function. On the last day of treadmill training, the animals were adapted 3 times to cross the narrow beam and the horizontal ladder. The sensorimotor test was performed the following day. For each test, the animals were filmed (DCR-DVD 205, Sony, USA) 3 times from a lateral view.

HLRWT apparatus was a 100 cm long and 15 cm wide, with horizontal parallel metal rungs (3 mm diameter) which could be inserted in sequence to create a floor with a minimum distance of 2 cm between rungs, elevated 30 cm above the floor and with a little dark box at the end, the animals were required to walk along the horizontal ladder.

NBT consisted of walking crossing a 100 cm-long, 3 cm-wide flat surface beam, elevated 30 cm above the floor, the animals were required to walk along the narrow beam and reach a little dark box at the end.

The analyses of HLRWT and NBT consisted of observing the animal crossing these apparatus and counting the number of hindlimb step errors. Failure to accurately place the foot on the beam or ladder rung was considered an error.

Electrophysiological Technique

Following this 5-week period of treadmill training and tests, the animals were anesthetized using sodium thiopental (40 mg/kg, i.p.; Cristalia, Brazil). After trichotomy, 5 incisions of approximately 1 mm each were made into which and needle electrodes were inserted to stimulate the right sciatic nerve (figure 1). Two electrodes were positioned 1 cm apart, the first one close to the sciatic nerve trunk and the second proximal to the crush site. The other two electrodes were inserted, 1 cm apart, into the gastrocnemius muscle. Finally, one ground electrode was inserted. The two electrodes

positioned close to the sciatic trunk were responsible for stimulating the nerve trajectory while the two electrodes positioned in the gastrocnemius muscle registered the action potential. Muscular action evoked potential was determined by means of supra-maximum electric current stimulation using a two-channel electromyograph (Neurosoft®, Brazil), linked to a computer (Acer, Brazil) with Neuro-MEP.net software for the evaluations. A sampling rate of 200 Hz to 80 Hz was used with a frequency filter of 2 Hz.

Histological and Morphometrical Nerve Studies

Following the above-mentioned procedures, the animals were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.; Cristália, Brazil). For nerve regeneration analysis, a segment (~3 mm) of the right sciatic nerve was rapidly excised, distal to the crush injury site. The specimens were fixed by immersion in a solution of 0.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co, St Louis, Missouri) and 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4; PB). After this, the material was postfixed in 1% OsO₄ (Sigma Chemicals Co) in PB, dehydrated in a graded series of alcohol and propylene oxide (Electron Microscopy Sciences, USA), embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland), and polymerized at 60°C. Transverse-semithin sections (1 µm) were obtained using an ultramicrotome (MT 6000-XL, RMC, Tucson, Arizona) and stained with 1% toluidine blue (Merck, Germany) in 1% sodium tetraborate (Ecibra, Brazil). Afterward, images of the right sciatic nerve were digitized (initially 1000× and further amplified 200× for analysis) using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Tokyo, Japan) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland). For morphological evaluation, a set of 8 images was obtained from each nerve, 4 random

images from the periphery and 4 random images from the center of the nerve, in order to ensure a representative area per nerve segment (1161.5 μm^2 ; 100% of the area analyzed per segment).¹³ The average number of fibers analyzed per nerve was 158.

Morphometrical measurements included the (1) myelinated fiber density (number of fibers/ mm^2); (2) *g* ratio (the quotient axon diameter/fiber diameter, a myelinated fiber maturation index); (3) percentage areas of myelinated fibers (%) and (4) of endoneurial connective tissue (%).

Individual myelinated fibers were counted and the myelinated fiber density was determined by examining the ratio of the myelinated fibers/total area analyzed. The measurements of areas were estimated with a point counting technique using grids with a point density of 1 point per 1.53 μm^2 and the following equation:

$$\hat{A} = \Sigma p \cdot a/p,$$

where \hat{A} is the area, Σp the sum of points, and a/p the area/point value (3.24 μm^2). The values of the areas of myelinated fibers and of endoneurial connective tissue were shown in percentages, considering that 1161.5 μm^2 was 100% of the analyzed area in each nerve segment. To estimate the axon and fiber diameters, the area of each individual fiber was measured and the value obtained was converted to the diameter of a circle having an equivalent area.

Data Analysis

Sensorimotor, electrophysiological tests and morphometric measurements of the sciatic nerve were analyzed using repeated measures one-way ANOVA. All analyses were followed by *post hoc* Duncan's test. Data were run on SPSS® 11.5 (Statistical Package for the Social Science, Inc., Chicago, USA) with significance set at $p < 0.05$. All means are presented as \pm standard error of the mean (SEM).

Results

Sensorimotor tests

Hindlimb sensorimotor function was evaluated by applying the horizontal ladder rung walking test (HLRWT) and narrow beam test. In the HLRWT, the number of the hindlimb slips was significantly greater in the young untrained injured group (1.3 ± 0.28 ; $p < 0.05$) when compared to the young control (0.4 ± 0.07) and young trained injured (0.6 ± 0.34) groups. No difference was found between the mature groups (MCon, MInj and MTr) and when the young and mature groups were compared (Figure 2A).

In the narrow beam test, the number of the hindlimb slips was statistically greater in the young injured (0.8 ± 0.18 ; $p < 0.05$) when compared to young trained (0.2 ± 0.06) groups. The mature untrained injured group (1.5 ± 0.26 ; $p < 0.05$) had a greater number of hindlimb slips when compared to the mature control (0.4 ± 0.15) and mature trained injured (0.5 ± 0.08) groups. In the young and mature groups, fewer hindlimb slips were seen in the young untrained injured group (0.8 ± 0.18 ; $p < 0.05$) when compared with the mature untrained injured (1.5 ± 0.26) groups (Figure 2B).

Electrophysiological Analysis

The electrophysiological analysis showed there was a greater action potential amplitude in the gastrocnemius muscle in the young control group (27 ± 0.11 mV; $p < 0.05$) when compared to the young untrained injured (10 ± 0.90 mV) and young trained injured (15 ± 1.08 mV) groups. However, the young trained injured group (15 ± 1.08 mV; $p < 0.05$) had a significantly greater evoked potential of the same muscle

when compared to the young untrained injured group (10 ± 0.9 mV), demonstrating the benefit of the treadmill training in this evaluation.

Similarly, the mature control group (22 ± 3.03 mV; $p < 0.05$) had a greater action potential amplitude in the gastrocnemius muscle when compared to the mature untrained injured (6 ± 0.73 mV) and mature trained injured (11 ± 1.38 mV) groups.

When comparing the young and mature groups, a smaller action potential amplitude was observed in the mature control group (22 ± 3.03 mV; $p < 0.05$) in relation to the young control rats (27 ± 0.11 mV), suggesting a possible decrease in the muscular action potential with aging (Figure 3).

Histological and Morphometric Nerve Studies

Structural analysis of the nerves revealed some differences between the young and mature groups (Figure 4). The mature control group had a greater myelinated fiber diameter and a smaller myelinated fiber density. In addition, the histological characteristics of the endoneurial connective tissue between the myelinated fibers were greater in all mature groups.

The untrained and trained injured groups of the both ages were shown to have an increased endoneurial connective tissue space between the fibers and degeneration debris. The myelinated fiber density was higher in the young and mature untrained injured groups and lower in the young trained injured group with a similar aspect to that found in the young control group.

Analysis of the morphometrical data revealed that the young untrained injured group (23.009 ± 1.661 fibers/mm²; $p < 0.05$; Figure 5A) showed a higher myelinated fiber density when compared to the young control (16.521 ± 905 fibers/mm²) and trained injured (17.082 ± 1.054 fibers/mm²) groups. In the mature groups we found a higher

myelinated fiber density in both the untrained injured (14.406 ± 1.324 fibers/mm²; $p < 0.05$) and trained injured (15.469 ± 429 fibers/mm²; $p < 0.05$) groups in relation to the mature control group (12.895 ± 491 fibers/mm²). Comparing the different age groups, the young control and young untrained injured groups had a higher density of myelinated fibers in relation to the mature control and mature untrained injured groups ($p < 0.05$), respectively.

Myelinated fiber maturation, estimated by means of *g* ratio analysis, was more scanty in the young untrained and trained injured groups (0.712 ± 0.003 and 0.714 ± 0.015 , respectively) compared to the young control group (0.658 ± 0.003 ; $p < 0.05$; Fig. 5B). Similarly, in the mature untrained and trained injured groups (0.746 ± 0.009 and 0.728 ± 0.013 , respectively) the myelinated fiber maturation was more scanty when compared to the mature control group (0.640 ± 0.013 ; $p < 0.05$).

When examining the morphometrical measurements for the percentage area of myelinated fibers, the young untrained and trained injured groups ($31 \pm 2.18\%$ and $26 \pm 2.21\%$, respectively) had a smaller percentage area of myelinated fibers than the young control group ($73 \pm 2.28\%$; $p < 0.05$; Fig. 6A). Likewise, the mature untrained and trained injured ($18 \pm 1.98\%$ and $22 \pm 1.71\%$, respectively) groups had a smaller percentage area of myelinated fiber than the mature control group ($63 \pm 1.50\%$; $p < 0.05$). In relation to the different ages, we observed a greater percentage area of myelinated fiber in the young control group when compared to the mature control group. The opposite is true, in relation to the percentage area of connective tissue (Fig. 6B), the young and mature untrained and trained injured groups have a greater percentage area of connective tissue than the respective young and mature control groups. There is a difference between different ages, with all the mature groups having a greater percentage area of connective tissue than all the young groups.

Discussion

Experimental traumatic lesion of rat sciatic nerve produces similar hindlimb motor function deficits to those found in peripheral neuropathies observed in humans.^{13,14} Several studies have attempted to clarify the regenerative process of peripheral nerves after injuries. During aging, the regenerative process after PNL tends to be delayed due to the slow plasticity of the nerve.^{7,15,16} However, many studies report functional and morphological benefits of treadmill training after sciatic nerve injury in young rats,^{8,17} but there is a noticeable absence of findings regarding mature rats. Thus, the object of the present study was investigate the different effects of treadmill training on sciatic nerve regeneration after a crush model in young and mature rats.

A horizontal ladder rung walking test (HLRWT) and the narrow beam test were used to investigate the sensorimotor functionality of the animals. These tasks are easily performed in intact rats, requiring fine sensorimotor control and precise foot placement.^{18,19,20} Our findings in the HLRWT test, showed that treadmill training were not effective in improving the motor function of the injured limb. On the other hand, in the narrow beam test, the treadmill training was shown to reduce the number of slips made by young and mature injured animals. The reason for this apparent discrepancy is not known, however, these tests assess different aspects of motor performance: the narrow beam test is a very sensitive method of monitoring discrete deficits in foot placement and body balance while the horizontal ladder walking test is more sensitive for evaluating the sensorimotor coordination of the limbs and the descending motor control of motor pathways.²¹ Therefore, the narrow beam test could be considered more

sensitive to peripheral nerve injuries, since this type of lesion especially causes deficits in foot placement.^{8,10}

It is known that the decrease in amplitude of the muscle action potential is roughly proportional to the degree of axonal loss. This loss of amplitude is also related to changes in the neuromuscular junction.²² Five weeks of treadmill training improved muscle action potential in the young injured animals, although, regarding this parameter, this intervention does not seem to achieve the same beneficial effect in mature injured animals. Additionally, the mature control animals present smaller action potential amplitude in the gastrocnemius muscle when compared to the young control animals. Similarly to our results,⁹ found enhanced electromyographic parameters after 24 days of exercise training in adult rats submitted to sciatic nerve crush lesion.

In relation to the morphological findings, the myelinated fiber density increased after injury and decreased after treadmill training in injured young animals. In some early stages after peripheral nerve lesion (PNL), axons may increase the connectivity with their target cells compared to normal adult rats.^{23,24} This polyneuronal innervation is substituted by mononeuronal innervation, when synapses are competitively eliminated from the new motor units through axonal sprouting and regeneration of injured motor axons to endplates occupied by sprouts.²⁵ The substitution of polyneuronal by mononeuronal innervation is reestablished when the motor activity is restored.²⁶ In the present study, treadmill training possibly led to a decrease in poly-innervation as well as an increase in the muscular action potential, suggesting that motor units became more functional after exercise.

A reduction in the number or density of myelinated fibers in peripheral nerves has been reported with aging.^{27,28,29} In this study, a smaller myelinated fiber density is

shown in the mature animals when compared to the young. This result may support the muscle action potential amplitude findings reported here, since the mature control animals present lower action potential amplitude in relation to the young control animals. In agreement with our results, other studies have also detected evidence of an age-dependent reduction in electrophysiological parameters.^{29,30} Furthermore, spontaneous denervation, which normally occurs in aging muscle, is distinguished by a reduction in the average number of motor units.^{29,31}

Although axonal regeneration and reinnervation mechanisms are maintained throughout life, they become slower and less effective with increased age.^{32,33} Normal aging brings several changes in the peripheral nerves, including a decrease in the number of myelinated fibers,³⁴ impaired Schwann cell-axon interaction,³⁵ splitting of myelin sheaths, redundant myelin and disruption of Ranvier's node.³⁶ In agreement with this, our results showed an increase in the myelinated fiber maturation index (*g* ratio) in untrained and trained injured young and mature animals compared to the respective control groups, representing a reduction in myelinated fiber maturation. In addition, the percentage of myelinated fiber increased in injured and trained groups.

In conclusion, our data provide evidence that moderate treadmill training could be used as therapy after traumatic crush injury in young animals. The aging process reduces the effectiveness of this intervention due to the reduction of recovery in the electrophysiological and morphological parameters analyzed. However, in mature animals, treadmill training was able to increase the functionality of the animals submitted to peripheral nerve injury. We suggest that more investigations are necessary in order to test if a longer training program may lead to electrophysiological and morphological gains, or if the association with other therapies used in clinical practice,

is able to accelerate improvement in patients with peripheral neuropathies during the aging process.

Acknowledgments

We would like to thank Antonio G. Severino and Silvia Barbosa for their technical assistance. This research was supported by UFRGS and the Brazilian funding agency CNPq. N. B. Cunha was supported by an MSc scholarship from CNPq, and M. Achaval is a CNPq investigator.

References

- 1 Monte Raso VL, Barbieri CH, Mazer N, et al. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods* 2005;142:185–92.
- 2 Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *AJOB Neurosci* 1995;15:3876-85.
- 3 Ruitter GCW, Malessy MJA, Alaid AO, et al. Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. *Exp Neurol* 2008;211:339-50.
- 4 Hess JR, Brenner MJ, Myckatyn TM, et al. Influence of aging on regeneration in end-to-side neurorrhaphy. *Ann Plast Surg* 2006;2:217-22.
- 5 Bowe CM, Kocsis JD, Waxman SG, et al. Physiological properties of regenerated rat sciatic nerve following lesions at different postnatal ages. *Brain Res* 1987;431:123–31.

6 Pola R, Apraihamian TR, Bosch-Marce M, et al. Age-dependent VEGF expression and intraneural neovascularization during regeneration of peripheral nerves. *Neurobiol Aging* 2004;25:1361–8.

7 Kerezoudi E, Thomas PK. Influence of age on regeneration in the peripheral nervous system. *Gerontology* 1999;45:301-6.

8 Ilha J, Araujo RT, Malysz T, et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 2008;4: 355-66.

9 Van Meeteren NLU, Brakkee JH, Hamers FPT, et al. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil* 1997;78:70-7.

10 Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, et al. Nerve crush injuries: a model for axonotmesis. *Exp Neurol* 1994;127:284-90.

11 Melo RM, Martinho E, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR. Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension* 2003;42: 851-57.

12 Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FAMS. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol* 2005;140:409-13.

13 De Medinacelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77:634-43.

14 Ilha J, Peyré-Tartaruga LA, Araujo RT, et al. Locomotor behavior assessment in the rat by kinematic analysis. *J Biomech* 2006;39:S507.

15 Choi SJ, Harji K, Lee MJ, et al. Electrophysiological, morphological and morphometric effects of aging on nerve regeneration in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand* 1995;29:133-40.

16 Tanaka K, Webster HF. Myelinated fiber regeneration after crush injury is retarded in sciatic nerves of aging mice. *J Comp Neurol* 1991;308:180-7.

17 Sabatier MJ, Redmon N, Schwartz G, et al. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. *Exp Neurol* 2008;211:489-93.

18 Metz GA, Whishaw, I.Q. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods* 2002;115:169-79.

19 Buddeberg BS, Kerschensteiner M, Mekler D, et al. Behavioral testing strategies in a localized animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004;153: 158–70.

20 Marcuzzo S, Dutra MF, Stigger F, et al. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain Dev* 2010;32:323-331.

21 Sedý J, Urdzíkova L, Jendelová P, et al. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rat. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:550–80.

22 Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol* 2008;119:1951-65.

- 23 Grinnell AD. Dynamics of nerve-muscle interaction in developing and mature neuromuscular junctions. *Physiol Rev* 1995;75:789-834.
- 24 Lohof AM, Delhay-Bouchaud N, Mariani J. Synapse elimination in the central nervous system: functional significance and cellular mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 1996;7:85-101.
- 25 Costanzo EM, Barry JA, Ribchester RR. Competition at silent synapses in reinnervated skeletal muscle. *Nat neuroscience* 2000;7:694-700.
- 26 Barry JA, Ribchester RR. Persistent polyneuronal innervations in partially denervated rat muscle after reinnervation and recovery from prolonged nerve-conduction block. *AJOB Neurosci* 1995;15:6327-39.
- 27 Jacobs JM, Love S. Quantitative and qualitative morphology of human sural nerve at different ages. *Brain* 1985;108: 897-924.
- 28 Wheeler SJ, Plummer JM. Age-related changes in the fiber composition of equine peripheral nerve. *Integr Physiol Behav Sci* 1989;90:53-66.
- 29 Verdu E, Ceballos D, Vilches JJ, et al. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 2000;5:191-208.
- 30 Metso AJ, Palmu K, Partanen JV. Compound nerve conduction velocity – A reflection of proprioceptive afferents? *Clin Neurophysiol* 2008;119:29-32.
- 31 Wineinger MA, Sharman RB, Stevenson TR, et al. Peripheral nerve and muscle function in the aging Fischer 344/brown-Norway rat. *Growth Dev Aging* 1995;59:107-19.

- 32 Carlson BM, Faulkner JA. Reinnervation of long-term denervated rat muscle freely grafted into an innervated limb. *Exp Neurol* 1988;102:50-6.
- 33 Jacob JM, Robbins N. Age differences in morphology of reinnervation of partially denervated mouse muscle. *AJOB Neurosci* 1990;10:1530-40.
- 34 Mortelliti AJ, Malmgren LT, Gacek RR. Ultrastructural changes with age in the human superior laryngeal nerve. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg* 1990;116:1062-69.
- 35 Wang YJ, Zhou CJ, SHI Q, et al. Aging delays the regeneration process following sciatic nerve injury in rats. *J Neurotrauma* 2007;24:885-94.
- 36 Hinman JD, Peters A, Cabral H, et al. Age-related molecular reorganization at the node of Ranvier. *J Comp Neurol* 2006;495:351-62.

Figure 1. Digitalized image of distribution the needle electrodes during the electrophysiological test. The first two electrodes were positioned at 1 cm of distance from each other, close to the sciatic nerve trunk and proximal to the crush site; other two electrodes were inserted into gastrocnemius muscle, also 1 cm of distance between them; finally, one ground electrode was inserted.

Figure 2. Comparison of the sensorimotor analysis determined by (A) Horizontal ladder rung walking test and (B) Narrow beam test on the rats of different ages. Graphics show the slips on the trials of the test. Data are expressed as means and SEM. Letter “a” to $p < 0.05$ when compared to the ConY group, “b” corresponds to $p < 0.05$ when compared to the ConM group, “c” to $p < 0.05$ when compared to the TrY group, and “d” to $p < 0.05$ when compared to the TrM group. “*” to $P < .05$ when compared Y to the M group. Con, control; In, injured; Tr, trained; Y, young; M, mature.

Figure 3. Analysis of treadmill training on the muscular evoked potential on the rats of different ages. Graphics show the amplitude of evoked potential. Data are expressed as means and SEM. Letter “a” corresponds to $p < 0.05$ when compared to the ConY group, “b” to $p < 0.05$ when compared to the ConM group, and “c” to $p < 0.05$ when compared to the TrY group. “*” to $p < 0.05$ when compared Y to the M group. Con, control; In, injured; Tr, trained; Y, young; M, mature.

Figure 4. Digitized images of transverse-semithin sections ($1 \mu\text{m}$) obtained from regenerated sciatic nerves after 5 weeks of treadmill training. Note between the different ages, the apparent unimodal fiber spectrum with a predominance of large diameter of the myelinated fibers in the control mature group; also, note the greater endoneurial connective tissue between the nerve fibers. In the untrained injured young and mature groups, mature group had smaller myelinated fibers density, increase the endoneurial connective tissue between the nerve fibers and presented degeneration debris. The trained injured young and mature groups was similar, the most important difference was the increase endoneurial connective tissue between the nerve fibers in the mature group. Mf indicates myelinated nerve fiber; Uf, unmyelinated nerve fiber; Sc, Schwann cell; * (asterisk), endoneurial connective tissue; Db, degeneration debris; BV, blood vessel. Semithin sections were stained with toluidine blue. Scale bar = $20 \mu\text{m}$.

Figure 5. Effects of treadmill training on the morphometrical parameters of regenerating right sciatic nerve fibers. Graphics show the density of myelinated fibers of the nerves (A); and the G ratio of the nerves (B). Data are expressed as means and SEM. Letter “a” to $p < 0.05$ when compared to the ConY group, “b” corresponds to $P < .05$ when compared to the ConM group, “c” to $P < .05$ when compared to the TrY group. “*” to $p < 0.05$ when compared Y to the M group. Con, control; In, injured; Tr, trained; Y, young; M, mature.

Figure 6. Effects of treadmill training on the morphometrical parameters of regenerating right sciatic nerve fibers. Graphics show the percentage area of myelinated fibers of the nerves (A); and, the percentage area of endoneurial connective tissue of the nerves (B). Data are expressed as means and SEM. Letter “a” to $p < 0.05$ when compared to the ConY group, “b” corresponds to $p < 0.05$ when compared to the ConM group. “*” to $P < .05$ when compared Y to the M group. Con, control; In, injured; Tr, trained; Y, young; M, mature.

Figure 1

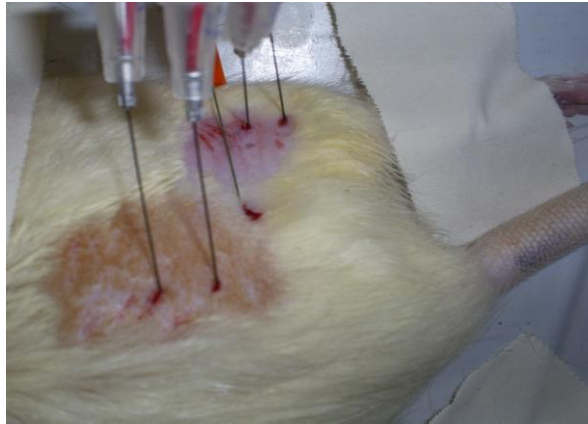
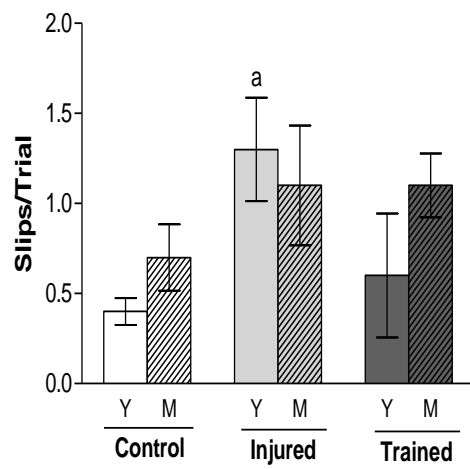


Figure 2

A



B

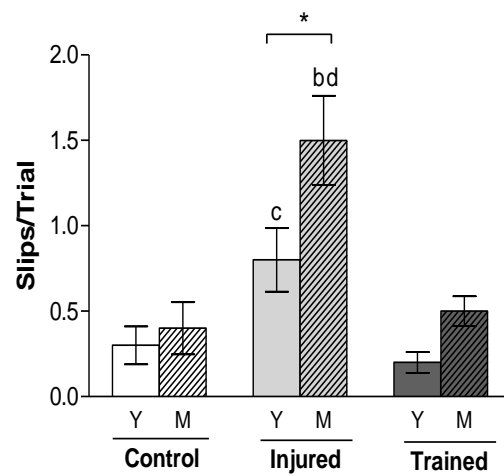


Figure 3

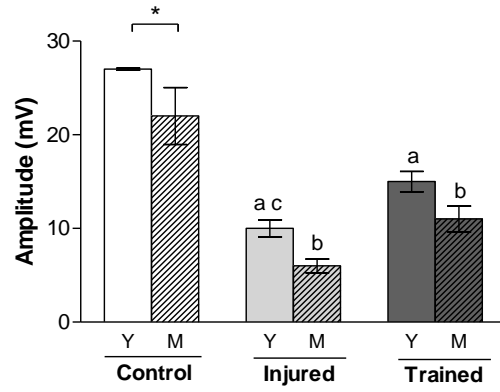


Figure 4

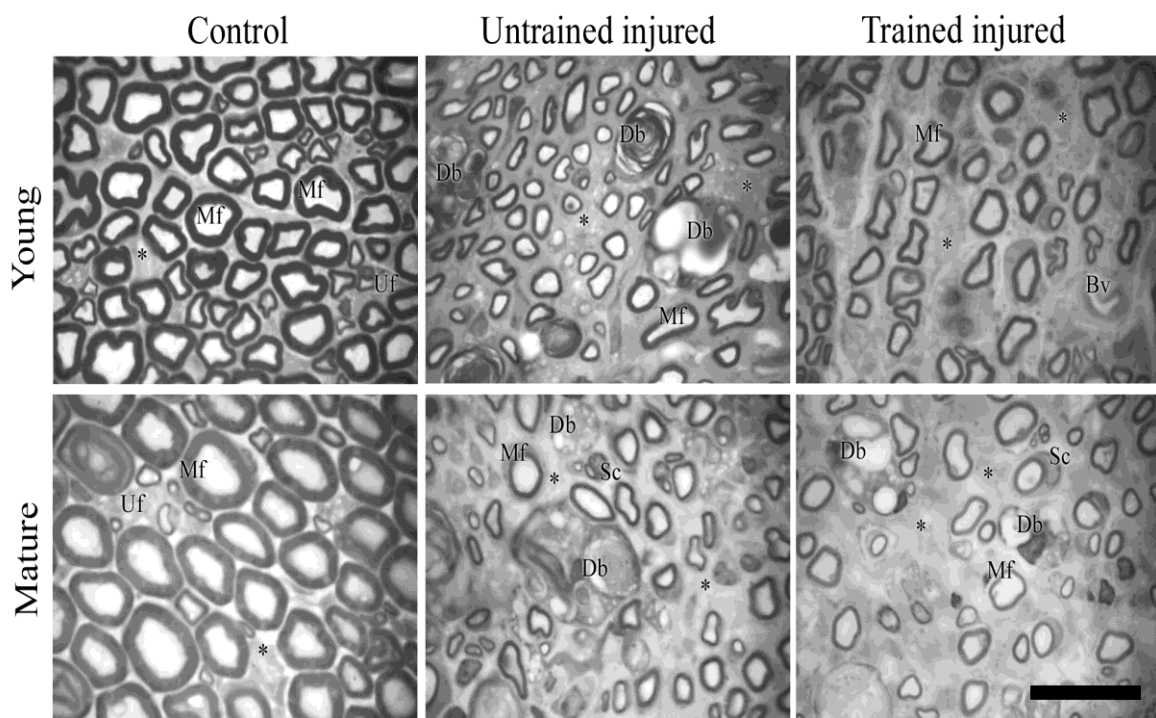


Figure 5

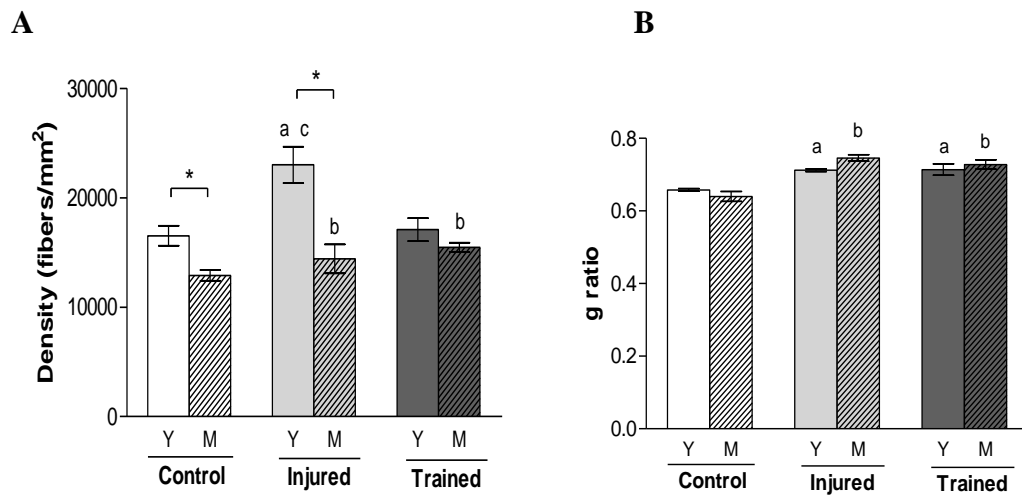
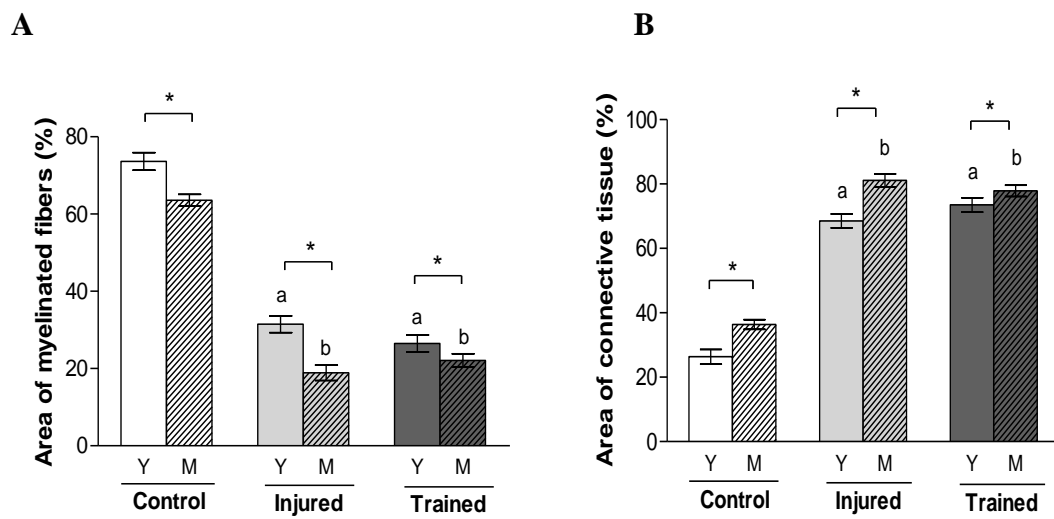


Figure 6



5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste trabalho sugerem evidências de que o treinamento em esteira auxilia no processo de regeneração do nervo ciático após uma lesão traumática experimental deste nervo em ratos jovens.

Observa-se, desta maneira, melhora na função sensoriomotora a partir da redução do número de erros da pata posterior lesionada ao realizarem o *Narrow beam test*; aumento da amplitude do potencial de ação do músculo gastrocnemio e redução da densidade de fibras mielínicas do nervo ciático de ratos jovens após o treinamento em esteira. Esses dois últimos resultados predizem que ocorreu uma inervação mais funcional do músculo gastrocnemio, pois nos grupos somente submetidos à lesão houve aumento da densidade de fibras mielínicas, caracterizando uma poli-inervação, buscando compensar a inervação prejudicada com a lesão. Enquanto que com o treinamento em esteira a densidade de fibras mielínicas foi menor, já que a mesma possivelmente tornou-se mais funcional com o exercício.

O processo de envelhecimento reduziu a efetividade da intervenção terapêutica proposta neste estudo, baseado na ausência da recuperação nos parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos analisados. Entretanto, houve melhora na função sensoriomotora dos animais maduros com o treinamento em esteira, sendo observada a partir da redução do número de erros da pata posterior lesionada; porém não houve diferença significativa na análise eletrofisiológica e morfológica destes animais. Portanto, sugerimos que sejam realizadas mais pesquisas com um período maior de

treinamento para observar se a melhora funcional é seguida da melhora dos parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos em animais maduros.

Além do retardo na regeneração associado ao envelhecimento e da influência do período de treinamento serem fatores considerados de suma importância para uma consistente recuperação de pacientes com neuropatia periférica, outro fator importante é que na prática clínica a reabilitação é realizada com a associação de diferentes recursos terapêuticos, como: treino proprioceptivo, exercícios de força muscular, treinamento de equilíbrio e coordenação, entre outros, que somados ao treinamento em esteira são responsáveis pela melhora do paciente com déficits devido à neuropatia periférica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERGHINA, M., VIOLA, M., MOSCHELLA, F., GIUFFRIDA, A.M. Axonal transport of glycerophospholipids in regenerating sciatic nerve of the rat during ageing.

Journal of Neuroscience Research, 9: 393-400, 1983.

BOWE, C.M., KOCSIS, J.D., WAXMAN, S.G., WILDEBRAND, C. Physiological properties of regenerated rat sciatic nerve following lesions at different postnatal ages.

Brain Research, 431:123–131, 1987.

CHOI, S.J., HARJI, K., LEE, M.J., FURUYA, F., UEDA, K. Electrophysiological, morphological and morphometric effects of aging on nerve regeneration in rats.

Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery Hand, 29: 133-140, 1995.

COQ, J.O., XERRI, C. Age-related alteration of the forepaw representation in the rat primary somatosensory cortex. **Neuroscience**, 99, 3: 403-411, 2000.

COX, J. M. **Dor lombar mecanismo, diagnóstico e tratamento**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2002.

DAHLIN, L.B., BRANDT, J. Basic science of peripheral nerve repair: wallerian degeneration/growth cones. **Operative Techniques in Orthopaedics**, 14: 138-145, 2004.

DE MEDINACELLI, L., FREED, W.J., WYATT, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, 77: 634-643, 1982.

ENGLISH, A. W., CUCORANU, D., MULLIGAN, A., SABATIER, M. Treadmill training enhances axon regeneration in injured mouse peripheral nerves without increased loss of topographic specificity. **The journal of comparative neurology**, 517: 245-255, 2009.

FREDERICKS, C.M. Disorders of the peripheral nervous system: the peripheral neuropathies. In: FREDERICKS, C.M., SALADIN, L.K. **Pathology of the motor systems: principles and clinical presentations**. Philadelphia: F.A. Davis Company, 346-372, 1996.

FU, S.Y., GORDON, T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. **Journal of Neuroscience**, 15: 3876-3885, 1995.

GORDON, T., SULAIMAN, O., BOYD, J.G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 8: 236-250, 2003.

HESS, J.R., BRENNER, M.J., MYCKATYN, T.M., HUNTER, D.A., MACKINNON, S.E. Influence of aging on regeneration in end-to-side neurorrhaphy. **Annals of Plastic Surgery**, v. 2, n. 57: 217-222, 2006.

IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**, 25: 101-121, 1996.

ILHA, J., ARAUJO, R.T., MALYSZ, T., HERMEL, E.E., RIGON, P., XAVIER, L.L., ACHAVAL, M. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, 4: 355-366, 2008.

KANDA, K., HASHIZUME, K. Effects of long-term physical exercise on age-related changes of spinal motoneurons and peripheral nerves in rats. **Neuroscience Research**, 31: 69-75, 1998.

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. **Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2006. 517-527.

KENNEDY, J.M., ZOCHODNE, D.W. Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 10, 2: 144-157, 2005.

KEREZOUDI, E., THOMAS, P.K. Influence of age on regeneration in the peripheral nervous system. **Gerontology**, 45: 301-306, 1999.

KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e biologia celular – uma introdução a patologia.**

2 ed. São Paulo: Elsevier / Medicinas Nacionais, 2008.

KOBAYASHI S, YOSHIKAWA H, YAMADA S. Pathology of lumbar nerve root compression. Part 2: morphological and immunohistochemical changes of dorsal root ganglion. **Journal of Orthopedic Research**, 22: 180-188, 2004.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência.** 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

LINDERMAN, E., LEFFERS, P., SPAANS, F., DRUKKER, J., KERCKOFFS, M., KOKE, A. Strength training in patient with myotonic dystrophy and hereditary motor and sensory neuropathy: a randomized clinical trial. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, 76: 612-620, 1995.

LOWRIE, M. Plasticidade. In: STOKES, M. **Neurologia para fisioterapeutas**, seção 1, cap. 6. São Paulo: Premier, 2000.

MARQUESTE, T., ALLIEZ, J.R., ALLUIN, O., JAMMES, Y., DECHERCHI, P. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. **Journal of Applied Physiology**, 96: 1988-1995, 2004.

MATSUURA, T., IKATA, T., TAKATA, S., KASHIWAGUSHI, S., NIWA, M., SOGABE, T., KOGA, K. Effect of weight bearing on recovery from nerve injury in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, 91: 2334-2341, 2001.

MONTE RASO, V.L., BARBIERI, C.H., MAZER, N., FASAN, V.S. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? **Journal of Neuroscience Methods**, 142: 185–192, 2005.

PIEHL, F., CULHEIM, S., HOKFELT, T., TABAR, G. Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depend on age and type of injury. **Experimental Brain Research**, 119: 191-204, 1998.

POLA, R., APRAIHAMIAN, T.R., BOSCH-MARCE, M., CURRY, C., GAETANI, E., FLEX, A., SMITH, R.C., ISNER, J.M., LOSORDO, D.W. Age-dependent VEGF expression and intraneural neovascularization during regeneration of peripheral nerves. **Neurobiology Aging**, 25, 10:1361–1368, 2004.

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. **Neuroscience Letters**, 387: 85-89, 2005.

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

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

RODRÍGUEZ, F.J., VALERO-CABRÉ, A., NAVARRO, X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. **Drug Discovery Today**, 1: 177-185, 2004.

RUITER, G.C.W., MALESSY, M.J.A., ALAID, A.O., SPINNER, R.J., ENGELSTAD, J.K., SONRENSON, E.J., KAUFMAN, K.R., DYCK, P.J., WINDEBANK, A.J. Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. **Experimental Neurology**, 211: 339-350, 2008.

SABATIER, M.J., REDMON, N., SCHWARTZ, G., ENGLISH, A.W. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. **Experimental Neurology**, 211: 489-493, 2008.

SATO, A., SATO, Y., SUZUKI, H. Aging effects on conduction velocity of myelinated and anmyelinated fibers of peripheral nerves. **Neuroscience Letters**, 53: 15-20, 1985.

SEDDON, H.J. Three types of nerve injury. In: ANDRAUS, R.A.C. **Os efeitos da irradiação com laser de baixa potência na regeneração do nervo fibular comum do rato submetido a esmagamento**. Ribeirão Preto, 2009. Dissertação (Mestrado em

Ciências Médicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, 2009.

SHOKOUHI, G., TUBBS, R.S., SHOJA, M.M., ROSHANGAR, L., MESGARI, M., GHORBANIHAGHJO, A., AHMADI, N., SHEIKHZADEH, F., RAD, J.S. The effects of aerobic exercise training on the age-related lipid peroxidation, Schwann cell apoptosis and ultrastructural changes in the sciatic nerve of rats. **Life Sciences**, 82: 840-846, 2008.

STOLL, G., MULLER, H.W. Nerve injury, axonal degeneration and neuronal regeneration: basic insights. **Brain Pathology**, 9, 2: 313-325, 1999.

SON, Y.J., THOMPSON, W.J. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. **Neuron**, 14: 133-141, 1995.

SON, Y.J., TRACHTENBERG, J.T., THOMPSON, W.J. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. **Trends in Neurosciences**, 19: 280–285, 1996.

VALERO-CABRÉ, A., NAVARRO, X. Functional impact of axonal misdirection on muscle reinnervation after peripheral nerve resection and graft or tube repair. **Journal of Neurotrauma**, 19: 1475-1485, 2002.

VALERO-CABRÉ, A., NAVARRO, X. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. **Journal of Neurotrauma**, 21: 95-108, 2004.

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. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, 78: 70-77, 1997.

VERDU, E., CEBALLOS, D., VILCHES, J.J., NAVARRO, X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 5, 4: 191-208, 2000.

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. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, 77: 64-69, 1996.

ZEPKA, R.F., DINSE, H.R. Thalamic reorganization in aged rats – emergence and loss of skin representations parallel use and disuse of body parts but are independent of latency shifts. **Society of Neuroscience**, 21: 197, 1995.

ZHANG, J., LUO, X., XIAN, C.J., LIU, Z., ZHOU, X. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. **European Journal of Neuroscience**, 12: 4171-4180, 2000.