



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

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS COTOS NEURAIS DE RATOS  
WISTAR APÓS SEGMENTECTOMIA DO FASCÍCULO LATERAL DO  
PLEXO BRAQUIAL DIREITO E TREINO AERÓBICO**

**FERNANDO SOARES CAMELIER**

**Porto Alegre**

**2011**



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

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS COTOS NEURAIS DE RATOS  
WISTAR APÓS SEGMENTECTOMIA DO FASCÍCULO LATERAL  
DO PLEXO BRAQUIAL DIREITO E TREINO AERÓBICO**

**FERNANDO SOARES CAMELIER**

**Orientadora : Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> . Maria Cristina Faccioni-Heuser**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Faccioni-Heuser por me proporcionar meios que aumentaram o meu conhecimento científico, por toda confiança, estímulo, por acreditar no meu potencial e incentivar-me a atingir meus objetivos .

Ao Prof. Dr. Leder Xavier pela paciência, dedicação e grande conhecimento científico e estereológico para a elaboração deste trabalho.

Aos demais Professores do Curso de Pós-graduação em Neurociências que proporcionaram momentos de pleno conhecimento nas suas disciplinas e por serem fonte de contínuo aprendizado.

Aos meus colegas Professores e aos Funcionários do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e em especial ao Prof. Dr. Geraldo Pereira Jotz por me incentivar na realização do curso de pós-graduação em neurociências.

Aos meus colegas do curso de Pós-Graduação em Neurociências da turma de 2009 e aos funcionários do laboratório de Histofisiologia Comparada, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde .

Agradeço aos meus colegas Juliana Dalibor Neves e Sandro Antunes da Silva, pelo auxílio na fase de experimentos deste trabalho.

Agradeço aos acadêmicos Alexandre da Silva Costa e Nigia Ramalho Arsego , meus monitores da disciplina de Anatomia Humana, pelo auxílio na realização deste projeto.

Agradeço em especial à Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Denise Zancan e ao Prof. Dr. Rui Campos que nas suas disciplinas, Neurobiologia dos Invertebrados e Neuroanatomia Comparada respectivamente, ajudaram-me a ampliar meu conhecimento em anatomia do reino animal, enriquecendo assim a disciplina de Anatomia Humana na qual eu leciono.

Agradeço a meus pais, Maria Beatriz e Emílio, que foram meus exemplos de vida e são os principais responsáveis por isto tudo.

À Marli, minha querida esposa e eterna namorada, por ter transformado minha vida com seu amor, carinho, ternura e tornar-me mais feliz a cada dia .

## RESUMO

A lesão isolada do plexo braquial não apresenta alta mortalidade, porém são marcantes as limitações funcionais nesta patologia traumática.

As sequelas graves da lesão estão associadas a diversos fatores, tais como, o padrão anatômico das raízes nervosas, seus ramos difusamente distribuídos, o intenso desenvolvimento de tecido fibroso ao redor dos cotos neurais lesados e o tratamento cirúrgico, que promove a formação de fibrose e prejudica a regeneração neural.

Neste trabalho, provocamos a lesão nervosa do fascículo lateral do plexo braquial, a segmentectomia, e iniciamos o treinamento aeróbico precoce em esteira ergométrica ao longo de seis semanas.

Foram randomizados vinte e oito ratos Wistar machos adultos distribuídos nos grupos controle (animais que não foram submetidos a cirurgia e que não foram treinados), sham sedentário (animais que foram submetidos a cirurgia de manipulação do fascículo lateral do plexo braquial, sem segmentectomia, e que não foram treinados), sham treinamento (animais que foram submetidos a manipulação do fascículo lateral do plexo braquial, sem segmentectomia, e que foram treinados), lesão treinamento (animais que foram submetidos a segmentectomia do fascículo lateral do plexo braquial e que foram treinados em esteira ergométrica) e lesão sedentário (animais que foram submetidos a segmentectomia do fascículo lateral do plexo braquial e que não foram treinados).

Os testes funcionais utilizados foram o *Narrow Beam* (teste da barra estreita), *Foot-fault* (teste da passagem pela trilha), *Cylinder* (teste do cilindro) e *Hanging Wire* (teste de apreensão no arame).

Nos estudos morfológicos dos cotos neurais proximal e distal do fascículo lateral do plexo braquial empregamos técnicas estereológicas para analisar a densidade axonal (número dos axônios por  $\mu\text{m}^2$  da secção transversal), a área da fibra (cálculo da área da secção transversal com contagem de pontos) e a espessura da bainha de mielina dos axônios (medida em  $\mu\text{m}$ ).

Os resultados dos testes funcionais realizados antes do início do treinamento demonstraram que os animais dos grupos lesão sedentário e lesão treinamento apresentaram aumento do número de erros na realização das tarefas do *Narrow beam*, *Foot-fault*, *Cylinder* e *Hanging Wire* em comparação com os animais dos grupos controle, sham sedentário e sham treinamento, para um nível de significância de  $p < 0,05$ . Durante o período de treinamento, os resultados dos testes funcionais demonstraram que os animais do grupo lesão sedentário apresentaram aumento do número de erros na realização das tarefas em comparação com os animais dos grupos controle, sham sedentário, sham treinamento e lesão treinamento, para um nível de significância de  $p < 0,05$ . Além disto, os animais do grupo lesão treinamento apresentaram diminuição do número de erros na realização das tarefas em comparação com os animais do grupo lesão sedentário, para um nível de significância de  $p < 0,05$ .

Os resultados da análise morfológica dos cotos neurais, proximal e distal, demonstraram que os animais do grupo lesão sedentário tiveram diminuição do número de axônios por  $\mu\text{m}^2$  (densidade axonal), diminuição da área dos axônios (área da fibra) e diminuição da espessura da bainha de mielina em comparação com os animais dos grupos controle, sham sedentário e sham treinamento para um nível de significância de  $p < 0,05$ .

Os animais do grupo lesão treinamento tiveram aumento do número de axônios por  $\mu\text{m}^2$  (densidade axonal), aumento da área axonal (área da fibra) e aumento da espessura da bainha de mielina em comparação com os animais do grupo lesão sedentário.

Concluimos que o treinamento aeróbico precoce em esteira ergométrica promoveu o desenvolvimento axonal nos cotos neurais proximal e distal dos animais do grupo lesão treinamento em comparação com os cotos neurais proximal e distal dos animais do grupo lesão sedentário.

## SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
1.1	Anatomia do Plexo Braquial Humano.....	2
1.2	Anatomia do Plexo Braquial do Rato Wistar.....	4
1.3	Modelos Experimentais de Plexo Braquial.....	9
1.4	Fisiopatologia do Trauma Axonal.....	10
1.5	Plasticidade e Regeneração Neural.....	11
1.6	Tratamento da Lesão Neural.....	12
1.7	Funções da Célula de Schwann.....	15
1.8	Aspectos Fisioterápicos no Trauma.....	17
2 .	Hipótese .....	20
3.	Objetivos.....	21
4.	Métodos, Resultados e Discussão .....	22
4.1	Artigo Científico.....	23
5.	Perspectivas.....	59
6.	Referências Bibliográficas.....	60



## APRESENTAÇÃO

A dissertação está organizada em tópicos: Introdução, Hipótese do trabalho, Objetivos, Métodos, Resultados, Discussão e Perspectivas.

A Introdução apresenta o embasamento teórico para a formulação da proposta da dissertação. O objetivo geral e os objetivos específicos estão dispostos na parte central do corpo da dissertação.

Todos os experimentos foram realizados e desenvolvidos no Laboratório de Histoфизиologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A lei nº 6638 datada de 08/05/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica foi o embasamento legal do presente estudo.

Os animais foram originários do C.R.E.A.L. do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os métodos, os resultados e a discussão estão incluídos no artigo científico que brevemente será submetido à revista "*Nerve and Muscle Journal*".

As Perspectivas abordam as possibilidades de futuros trabalhos a partir dos resultados descritos.

O item bibliografia lista as referências citadas na Introdução. As referências utilizadas no artigo estão listadas no corpo do mesmo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

C5.....	Quinta raiz nervosa cervical
C6.....	Sexta raiz nervosa cervical
C7.....	Sétima raiz nervosa cervical
C8.....	Oitava raiz nervosa cervical
T1.....	Primeira raiz nervosa torácica
C.....	Grupo Controle
SS.....	Grupo Sham Sedentário
ST.....	Grupo Sham Treinamento
LS.....	Grupo Lesão Sedentário
LT.....	Grupo Lesão Treinamento
NB.....	Narrow Beam Test
FF.....	Foot-fault Test
CYL.....	Cylinder Test
HW.....	Hanging Wire Test
FA.....	Fiber area
AD.....	Axonal Density (densidade axonal)
MS.....	Myelin Sheath (baínha de mielina)
1 W.....	First week ( primeira semana)
2 W.....	Second week (segunda semana)
3 W.....	Third week (terceira semana)

4 W..... Fourth week (cuarta semana)  
5 W.....Fifth week (quinta semana)  
6 W.....Sixth week (sexta semana)  
mf.....Myelinated fiber (fibra miélica)  
Sc.....Schwann cell (célula de Schwann)  
bv.....Blood vessel (vaso sanguíneo)  
\*(asterisk).....Endoneurial connective tissue (tejido  
conjuntivo endoneural)  
dd.....Degenerative debris (debris degenerativos)

## **LISTA DE FIGURAS**

## INTRODUÇÃO

Figura 1 Esquema do plexo braquial humano.....	3
Figura 2. Fotografia mostrando o plexo braquial de rato Wistar adulto.....	8

## ARTIGO

Figura 1. Results of the <i>Narrow Beam test</i> .....	50
Figura 2. Results of the <i>Foot-fault test</i> .....	51
Figura 3. Results of the <i>Cylinder test</i> .....	52
Figura 4. Results of the <i>Hanging Wire test</i> .....	52
Figura 5. Photomicrography of the neurals stumps.....	53
Figura 6. Results of the fiber area.....	54
Figura 7. Results of the axonal density .....	55
Figura 8. Results of the myelin sheath.....	56

## 1. INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos são estruturas fundamentais para o funcionamento de sistemas orgânicos e suas patologias abrangem uma gama de lesões que podem ser:

traumáticas, congênitas, neoplásicas, adquiridas, imunológicas, metabólicas, hereditárias e obstétricas .

A incidência anual mundial das lesões traumáticas do plexo braquial, que resultam em perda parcial ou total das funções neurológicas motoras, sensoriais ou autonômicas é superior a 500.000 novos casos (Rodriguez et al., 2004).

O Plexo braquial é um conjunto de raízes nervosas que se originam dos segmentos da medula espinhal cervical e torácica, e promove a inervação sensitivo-motora da cintura escapular, do membro superior, da região peitoral e da região toracodorsal (Keith-Moore, 2006; Gray, 2008).

As plexopatias braquiais mais comuns são de origem traumáticas por acidentes de trânsito, seguidas por lesões de origem obstétrica. No Brasil, a incidência das plexopatias braquiais de origem traumática é de 1,75 para cada 100.000 habitantes (Flores et al., 2006).

Nas lesões dos nervos periféricos em geral verifica-se que 14% dos casos acometem o membro superior e, 10% destes casos que atingem o membro superior, provocam lesão do plexo braquial (Mumenthaler et al., 1969).

As lesões do plexo braquial costumam afetar apenas um membro que, na maioria das vezes, é o membro dominante (Ferreira, 1999).

Dentre todas as plexopatias braquiais, 80% a 90% destas são decorrentes de traumatismos por acidentes de trânsito, em que os mecanismos fisiopatológicos das lesões variam entre tração, avulsão, esmagamento, ruptura parcial ou total das raízes nervosas e contusão seguida de edema traumático secundário ao trauma (Dubuisson et al., 2002).

## **1.1 Anatomia do Plexo Braquial Humano**

O plexo braquial humano é formado a partir de raízes nervosas ventrais e dorsais pré-ganglionares que formam raízes nervosas pós-ganglionares. Estas raízes pós-ganglionares emergem das quatro últimas raízes dos segmentos cervicais (C5, C6, C7, C8) e da primeira raiz torácica (T1) da medula espinhal, formando o plexo braquial típico. As raízes nervosas de C5 e C6 formam o tronco superior. A raiz nervosa de C7 forma o tronco médio e as raízes nervosas de C8 e T1 formam o tronco inferior.

Cada um dos troncos, superior, médio e inferior, possuem divisões anteriores e posteriores. As divisões anteriores do tronco superior e do tronco médio formam o Fascículo Lateral. A divisão anterior do tronco inferior forma o Fascículo Medial e as divisões posteriores dos troncos superior, médio e inferior formam o Fascículo Posterior (Figura 1) (Netter, 2008).

Os nervos peitoral lateral e musculocutâneo, e a raiz nervosa lateral do nervo mediano originam-se do Fascículo Lateral; os nervos axilar, nervo radial, nervo toracodorsal e o subescapular originam-se do Fascículo Posterior; os nervos peitoral medial, ulnar, cutâneo medial do braço, cutâneo medial do antebraço e a raiz nervosa medial do nervo mediano originam-se do Fascículo Medial (Gray, 2006).

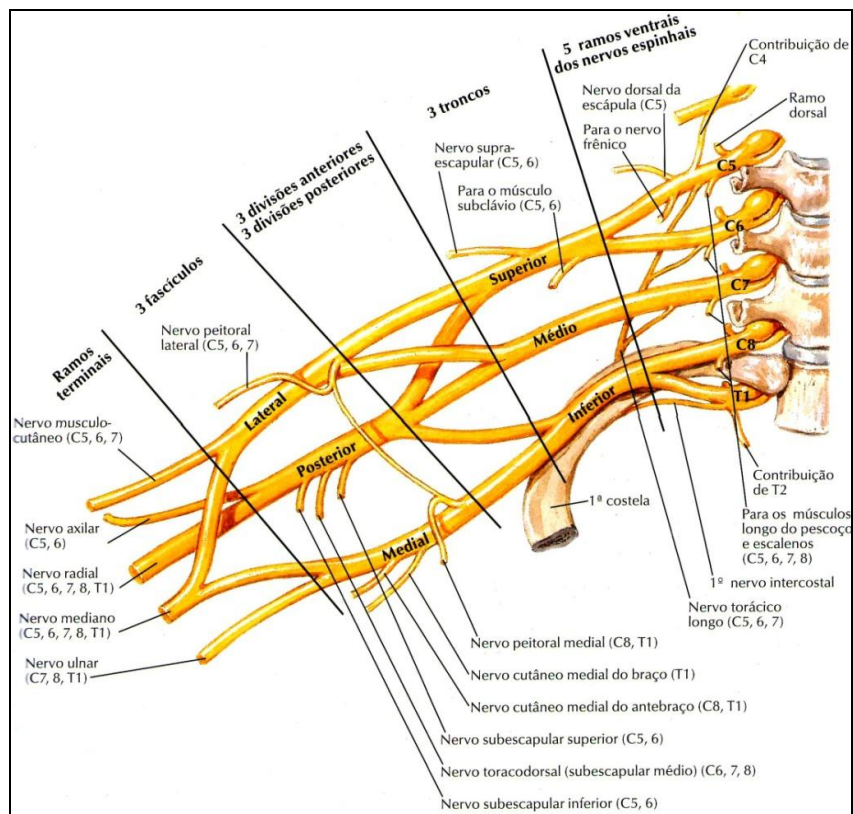


Figura 1- Esquema do plexo braquial humano, mostrando a origem das raízes dos segmentos medulares, a formação dos troncos e a formação das divisões seguidas pelos fascículos e as origens dos nervos periféricos (Netter, 2008).

## 1.2 Anatomia do Plexo Braquial do Rato Wistar

O plexo braquial é formado por divisões primárias das últimas quatro raízes nervosas cervicais e pela primeira raiz nervosa torácica, com uma contribuição acessória da segunda raiz nervosa torácica (Bertelli, 2005).

Os nervos periféricos do plexo braquial emergem entre os músculos escalenos anterior, médio e posterior, e a formação do plexo braquial ocorre na região axilar.

Em roedores, o plexo braquial apresenta maior dispersão de seus ramos que o plexo braquial de humanos. As divisões ventral e dorsal da quarta raiz nervosa cervical contribuem para formar o plexo cervical. O ramo da divisão ventral da quarta raiz cervical pode formar com o ramo da quinta raiz nervosa cervical o nervo frênico, que inerva o diafragma (Heber et al., 1986).

A quinta raiz nervosa cervical bifurca-se em raiz dorsal e ventral. A primeira contribui para formar o plexo cervical, após originar o nervo escapular dorsal para os músculos levantador da escápula e rombóides, enquanto que a divisão ventral forma com a divisão ventral da sexta raiz cervical uma parte do nervo frênico (Bertelli, 2006).

A sexta raiz nervosa cervical divide-se em ramo posterior dorsal e ramos da sétima e da oitava raízes cervicais formam o nervo torácico longo, para inervar músculo serrátil anterior. A sexta raiz cervical também origina o nervo para a inervação do músculo subclávio (Green, 1953). A divisão inferior da sexta raiz cervical forma um ramo ventral e três ramos dorsais. Dentre os ramos dorsais, o primeiro é o nervo supraescapular que inerva os músculos supraespinhal e infraespinhal; o segundo é o nervo que inerva o músculo subescapular; o terceiro é a primeira raiz do nervo axilar. O ramo ventral deste nervo é a



alça que formará a divisão ventral do sétimo nervo e originará o nervo musculocutâneo (Figura 2) (Bertelli et al., 1995).

O sétimo nervo cervical se bifurca em porções dorsal e ventral. A porção ventral subdivide-se em ramo anterior e posterior. O ramo anterior forma uma alça com a parte ventral do sexto nervo, esta alça origina dois finos nervos para o músculo peitoral maior.

O nervo musculocutâneo cruza a margem lateral do músculo redondo maior e penetra no braço, entre o músculo córacobraquial e a cabeça curta do músculo bíceps braquial, originando ramos que irão inervar o músculo braquial. O nervo musculocutâneo será, no antebraço, o nervo cutâneo lateral do antebraço (Heber et al., 1986).

Um ramo nervoso muscular acompanha a artéria braquial e inerva os músculos pronador redondo e flexor radial do carpo. Este ramo, abaixo do cotovelo, junta-se com ramos nervosos radiais e fornece a inervação cutânea da base do polegar e da região interdigital dorsal.

O ramo posterior da divisão ventral da sétima raiz cervical forma a primeira raiz do nervo mediano. A divisão dorsal contribui na formação do nervo torácico longo. Unindo-se a porção dorsal o ramo anterior da divisão ventral forma a segunda raiz do nervo axilar (Green, 1953).

O nervo axilar forma-se a partir da sexta e sétima raízes cervicais dividindo-se em ramos anterior e posterior; o ramo anterior é muscular e irá inervar o músculo deltóide, a articulação do ombro e uma região cutânea lateral do braço; o ramo posterior irá inervar o músculo redondo maior e redondo menor (Figura 2) (Bertelli et al., 1997).

O nervo mediano transita paralelamente a artéria braquial e o nervo radial, no braço. Nesta região, o nervo mediano não se ramifica, porém na região do cotovelo origina dois ramos; um ramo muscular que passa entre as cabeças do músculo flexor

dos dedos e o músculo palmar longo, inervando-os; e o ramo muscular profundo que irá inervar os músculos interósseos e flexores profundos e pronador quadrado (Green, 1953).

O nervo ulnar é menor que o nervo mediano e, por de trás do nervo mediano, penetra no braço acompanhado do nervo radial e da artéria braquial; ao atingir o cotovelo, o nervo ulnar cruza a artéria colateral ulnar e passa abaixo do músculo anconeu, seguindo para o antebraço, onde se-bifurca em um ramo profundo e outro superficial que irão inervar os músculos flexores ulnar do carpo e flexor profundo dos dedos, respectivamente.

O oitavo nervo cervical divide-se em ramos dorsal e ventral. Este último é maior e formado por duas partes; uma formará a porção do nervo mediano enquanto a outra originará o primeiro nervo torácico e a primeira raiz do nervo torácico anterior medial.

A pequena porção dorsal do oitavo nervo contribui na formação do nervo torácico longo e forma uma segunda porção para a formação do nervo radial. Então esse nervo é derivado das porções dorsais da sétima e da oitava raízes cervicais (Green, 1953).

Os nervos radial, ulnar e mediano e a artéria braquial saem da região axilar e seguem para o braço passando entre o músculo grande dorsal e o músculo máximo cutâneo do braço. Neste local, o nervo radial emite ramos musculares para as cabeças longa e medial do músculo tríceps braquial e para a cabeça curta do músculo bíceps braquial. Após este trajeto, contorna úmero e atinge a região lateral do braço emergindo entre a cabeça longa do músculo tríceps braquial e o músculo braquial (Figura 2) (Heber, 1986).

O nervo radial deixa o músculo tríceps braquial já inervando este músculo e ainda emitindo ramos que inervam o músculo coracobraquial. Após isto, o nervo radial inerva a região dorsal do antebraço. No cotovelo, o nervo radial irá se bifurcar em ramo superficial e profundo. O ramo superficial acompanha a artéria colateral radial e no meio do trajeto

forma os nervos digitais dorsais e, ao penetrar entre os espaços interdigitais, forma os nervos interdigitais para o segundo, terceiro e quarto dedos.

A porção lateral de um destes ramos digitais comunica-se com o nervo musculocutâneo, o que resulta no ramo digital do primeiro espaço interdigital.

O primeiro nervo torácico divide-se em um ramo calibroso, que se une à porção ventral da oitava raiz cervical, e que forma o nervo torácico anterior medial, este nervo apresenta uma distribuição cutânea na região peitoral; a seguir forma a terceira raiz do nervo mediano que é formado pela união das divisões ventrais do sétimo e oitavo nervos cervicais, sendo o maior nervo do plexo braquial (Figura 2).

O primeiro nervo torácico é um tronco calibroso que corresponde ao fascículo medial do plexo braquial de humanos. O segundo nervo torácico pode contribuir para formar um pequeno ramo do primeiro nervo torácico (Bertelli, 2006).

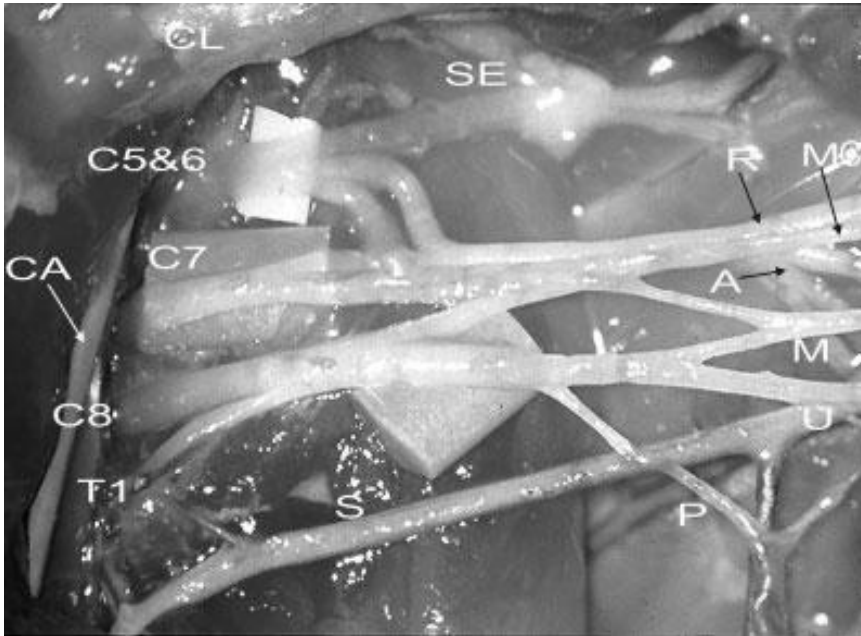


Figura 2 – Fotografia mostrando o plexo braquial de rato Wistar adulto:

(M) Nervo Mediano; (MC) Nervo Musculocutâneo (fascículo lateral); (U) Nervo Ulnar;  
 (R) Nervo Radial; (SE) Nervo Supraescapular; (A) Nervo Axilar; (P) Nervo Peitoral Medial; (S) Artéria Subclávia; (CL) Clavícula; (C5 & C6) – Quinta e sexta raízes cervicais; (C7) Sétima raiz cervical; (C8) Oitava raiz cervical; (T1) Primeira raiz torácica; (CA) Artéria Carótida (Bertelli, 2006).

### 1.3 Modelos Experimentais da Lesão de Plexo Braquial

O plexo braquial tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo da regeneração neural. A lesão do plexo braquial não causa autonomia ou contratura como ocorre na lesão do nervo ciático. Contratura e autonomia podem interferir nos resultados experimentais funcionais (Santos et al., 2007).

As lesões nervosas periféricas em humanos afetam as extremidades superiores, razão pela qual os modelos em ratos de lesões nervosas que afetam os membros anteriores são úteis (Bontioti et al., 2003). Uma vez que a distância para os órgãos alvo é pequena nos membros anteriores do rato (músculo e pele), a reinervação é rápida e o tempo requerido para a recuperação funcional é menor do que a dos membros posteriores (Bertelli & Mira 1993). Além disto, a locomoção, a limpeza e a alimentação e movimentos podem ser avaliados.

A partir da lesão no nervo periférico inicia-se uma seqüência complexa e regulada de eventos que visam remoção do tecido lesado, Isto é o início do processo de reparo e regeneração. O entendimento acerca da regeneração nervosa periférica cresceu de forma significativa com os avanços da biologia celular e molecular. As respostas frente ao dano periférico não envolvem somente reações locais, podem incluir modificações proximais e distais ao segmento lesado, bem como alterações no corpo neuronal, localizadas na medula espinhal e nos gânglios nervosos (Clarke & Richardson, 1994).

#### **1.4 Fisiopatologia do Trauma Axonal**

Os mecanismos causadores do dano podem ser de quatro tipos: 1- Contusão: quando ocorre um impacto externo direto sobre as raízes nervosas; 2- Compressão: quando existe uma pressão extrínseca como, por exemplo, hematoma, fragmento ósseo de fratura ou uma articulação deslocada; 3- Laceração: onde se rompem fibras das raízes nervosas 4- Ruptura: quando o plexo é seccionado por completo em suas raízes.

A primeira classificação para lesões de nervo periférico foi sugerida em 1952 por Sunderland e colaboradores, que dividiram as lesões em cinco graus: Grau I- perda da capacidade de condução do estímulo nervoso; Grau II- perda da continuidade dos axônios sem ruptura do tecido conjuntivo ao seu redor (endoneuro); Grau III- ruptura do endoneuro; Grau IV- ruptura dos fascículos e de suas bainhas de tecido conjuntivo (perineuro); Grau V- perda de continuidade do nervo, incluindo as bainhas de tecido conjuntivo (epineuro) (Sunderland et al., 1952).

Em 1975, Seddon e colaboradores propuseram uma classificação mais simplificada e dividiram as lesões traumáticas de plexo braquial em três grupos: Neuropraxia, Axonotmese e Neurotmese.

Na neuropraxia, a continuidade anatômica da raiz é preservada, mas ocorre uma desmielinização seletiva das grandes fibras nervosas ocasionando uma paralisia motora total com mínima atrofia muscular. A função sensorial é preservada e a condutividade elétrica nervosa distal está presente, não há necessidade de reparo cirúrgico e a recuperação é rápida; na axonotmese existe uma continuidade anatômica das fibras e da bainha de mielina, mas os axônios sofrem uma interrupção da condução e do fluxo axoplasmático. Ocorre a paralisia total, sensorial e motora, e a atrofia muscular

progressiva, é necessário reparo cirúrgico com intenção de recanalização da bainha neural; na neurotmeose existe uma desorganização tecidual completa, com uma efetiva perda de continuidade anatômica e funcional. No segmento distal da raiz ocorre a degeneração Walleriana e se observa uma completa paralisia motora e sensorial, com uma atrofia muscular progressiva irreversível (Seddon, 1975).

Com a lesão nervosa, o axônio e a bainha de mielina sofrem um processo de degeneração e serão eliminados pela ação das células de Schwann e macrófagos. Esta degeneração neural distal é chamada de degeneração Walleriana e promove um microambiente local que leva a remodelação e a reciclagem do tecido, preparando assim a área para a regeneração e crescimento do axônio proximal (Fawcett et al., 1990).

### **1.5 Plasticidade e Regeneração Neural**

A plasticidade das vias neurais centrais compensa fisiologicamente a falta de especificidade dos alvos para a reinervação e tem efeito limitado na localização sensorial ou no controle motor após danos teciduais (Navarro et al., 2007).

A regeneração axonal requer um substrato adequado onde participarão diversos mecanismos participantes dos processos regenerativos, os fatores tróficos produzidos pela célula de Schwann, macrófagos e a matriz extracelular, porém este processo não recupera totalmente as características morfológicas do nervo (Rodríguez et al., 2004).

Estudos mostram a importância do mecanismo de autoregulação mediado pela medula espinhal e pela musculatura comprometida. Este mecanismo é a expressão do Fator de Crescimento Neurotrófico que ocorre após a avulsão do plexo braquial (Song et al., 2001). As lesões nervosas sofrem uma regeneração que é realizada com sucesso graças

a favorável reação das células de Schwann, e quando existe a preservação da continuidade dos tubos endoneurais, estes fatores aumentam o prolongamento axonal e facilitam a adequada reinervação do alvo (Valero–Cabré et al., 2004).

Quando ocorre a lesão neural, as informações aferentes cutâneas dos membros são importantes para os movimentos e a perda desta informação contribui para um importante déficit funcional postural (Varejão & Filipe, 2007).

O sistema nervoso central responde as aferências dos músculos, dos tendões, dos ligamentos, das cápsulas articulares e dos receptores cutâneos para gerar uma efetiva resposta motora nos ajustes posturais na locomoção, assim como as informações de sensores visuais, vestibulares e somatosensoriais exercem um papel fundamental para controle dinâmico postural (Gauchard et al., 1999).

Existe, portanto, uma relação íntima do sistema nervoso central com estes mecanismos de retroalimentação sensorial, cuja finalidade é assegurar a performance cinética adequada. Quando este processo de retroalimentação é abolido ocorrerá o déficit funcional (Gandevia & Burke, 1992).

## **1.6 Tratamento da Lesão Neural**

O reparo do plexo braquial pós-trauma continua sendo um desafio para a medicina. Apesar da microcirurgia reconstrutiva ter sido um passo importante no progresso da recuperação funcional, a mesma é incompleta e insatisfatória. A morte neuronal, a fibrose consecutiva ao dano, o crescimento axonal lento e desorganizado estão relacionados com a alta morbidade das plexopatias traumáticas (Jonhson et al., 2005).



A existência de morte celular retrógrada em células ganglionares das raízes dorsais está bem estabelecido, porém o grau de desenvolvimento de tecido colágeno, fibrose tecidual e a relação entre o início do tratamento ainda é muito controverso (Novikov et al., 2001).

Na abordagem terapêutica das lesões de plexo braquial, o momento ideal para o tratamento definitivo ainda é motivo para muita discussão, porém existe uma tendência para o tratamento precoce com a intenção de recanalização do eixo axonal (Ma et al., 2003).

Existem muitos fatores associados para justificar o início do tratamento, se precoce ou tardio. Estes fatores são: grau da lesão, lesões associadas, técnicas cirúrgicas, experiência da equipe médica, patologias prévias, agentes e mecanismos causadores das lesões (Bertelli et al., 1997).

Estudos têm demonstrado que os exercícios proprioceptivos são importantes na reabilitação de lesões nervosas, pois ao se restaurar o déficit proprioceptivo o corpo manterá a estabilidade e a orientação durante as atividades estáticas e dinâmicas (Laskowski et al., 1997). O treinamento aeróbico proprioceptivo consiste em exercícios designados a dar ênfase no equilíbrio e coordenação motora (Seidler & Martin, 1997). Estes exercícios demonstraram uma significativa melhora motora em ratos em estado basal que foi constatada pela diminuição progressiva no número de erros durante as atividades propostas (Klein et al., 1997) e, também, devido a movimentação ocorrer com maior segurança e com menor hesitação conforme a evolução do treinamento. A diminuição significativa no tempo de realização das tarefas motoras, assim como a redução dos erros ao longo do treinamento, também ocorreu em ratos com lesão unilateral do córtex sensoriomotor do membro anterior e em animais submetidos a cirurgia de manipulação

sem lesão (sham), demonstrando que a melhora na habilidade motora também ocorreu em animais com lesões corticais (Jones et al., 1999). Além disto, este tipo de exercício, em ratos com lesão unilateral do córtex sensoriomotor do membro anterior, resultou numa melhora na performance do *footfault test* de membros anteriores e de membros posteriores quando comparado com o grupo controle. Também demonstrando uma melhora funcional em animais com lesão cortical neste tipo de treinamento. Os animais submetidos a cirurgia de manipulação sem lesão (sham) também apresentaram melhora da performance no *footfault test* de membros anteriores e de membros posteriores em comparação ao grupo controle (Chu & Jones, 2000).

Os exercícios motores acrobáticos foram utilizados no estudo de modificações morfológicas cerebelares, e verificou-se que, concomitante ao aprendizado de habilidades motoras, havia um aumento significativo do número de sinapses por célula de Purkinje na camada molecular do lóbulo paramedial do cerebelo (Black et al., 1990).

Estudos subseqüentes, utilizando exercícios aeróbicos, mostraram o aumento progressivo de sinapses nas fibras paralelas das células de Purkinje (Anderson, Alcantara & Greenough, 1996). Também foi observado o aumento de mitocôndrias sinápticas nos neurônios de animais submetidos a treinamento aeróbico e acrobático, comprovando a influência destes tipos de exercícios na plasticidade estrutural em regiões hemisféricas cerebrais lesadas, assim como em regiões não lesadas (Sakata et al., 2003).

## 1.7 Funções da Célula de Schwann

A secção de um nervo periférico produz alterações morfofuncionais observáveis na região proximal e distal da lesão. Na porção distal as alterações são dependentes de cálcio e constituem o processo denominado degeneração Walleriana ou anterógrada. As adaptações morfológicas primárias da degeneração são o edema e a fragmentação axonal, além da desorganização de neurotúbulos e neurofilamentos.

O contato entre o axônio e a célula de Schwann é perdido e ocorre a fragmentação e a degeneração da bainha de mielina. Neste processo, os macrófagos são recrutados da circulação periférica para o local da lesão e fagocitam e degradam os debris celulares (Shen et al., 2000).

As células de Schwann desempenham um importante papel nos processos da degeneração e da regeneração na lesão nervosa periférica. Estas células ficam ativas nas primeiras 24 horas após a lesão, exibem uma hiperplasia nuclear e citoplasmática e um aumento da taxa mitótica. A divisão celular é a responsável pela hiperregulação da expressão gênica de uma série de moléculas que ajudam em um processo de orientação e estimulação do crescimento dos neuritos em regeneração (Fawcett & Keynes, 1990).

Existe integração entre as células de Schwann e os macrófagos após uma lesão nervosa periférica. Nesta situação, as células de Schwann auxiliam os macrófagos na remoção dos debris axonais e resíduos de mielina. Os macrófagos produzem fatores de estimulação de mitose nas células de Schwann (Baichwal et al., 1988) e a regulação da síntese de fatores de crescimento por estas células (Lindholm et al., 1987).

No microambiente neural periférico são encontradas moléculas tróficas, dentre elas o fator de crescimento neural (NGF) e o fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF) que é o fator responsável pela maior capacidade de regeneração em lesões do sistema nervoso periférico quando comparadas com lesões do sistema nervoso central (David & Aguayo, 1981, Yan et al., 1992, Burnett & Zager, 2004).

As modificações do soma e dos segmentos proximais das fibras dependem do grau da lesão e também da proximidade entre o segmento lesado e o soma do neurônio (Cullheim et al., 2002).

As células de Schwann degradam os debris no segmento mais próximo da lesão e ocorre uma diminuição do diâmetro axonal e da bainha de mielina. Esta degradação pode ser mínima até o nó de Ranvier mais próximo ou estender-se até o soma neuronal. Assim, se o soma degenerar, todo o segmento proximal sofre degeneração. Isto é o que ocorre no trauma moderado e severo (Lundborg, 2000).

As lesões de nervos periféricos acometem as extremidades superiores e provocam uma impotência funcional na apreensão e manipulação de objetos (Duff, 2005). A qualidade do movimento, o potencial de regeneração nervosa e a recuperação funcional são objetos de diversos estudos (Van Meeteren et al, 1998 ; Gordon et al., 2003 ; Bontioti et al., 2005 ; Sabatier et al., 2008) .

A comunicação intercelular, a expressão de fatores de crescimento e a presença de moléculas de adesão locais são elementos importantes para ocorrer o processo de reinervação (Zhang et al., 2000; Makwana & Raivich, 2005; Vogelín et al., 2006).

Os mecanismos correlacionados com a expressão gênica e a regulação de neurotrofinas ainda não estão completamente elucidados, mas evidências mostram

aumento na expressão de membros da família de fatores tróficos associados ao grau da atividade neuromuscular (Sabatier et al., 2008).

A intensidade da atividade neuromuscular necessária para que exista o favorecimento da reinervação ainda não é consenso na literatura (Cup et al., 2007).

As deficiências funcionais provocadas pelas lesões nervosas podem ser compensadas por meio de mecanismos histofisiológicos: a reinervação dos órgãos alvo por regeneração do axônio lesado, a reinervação por ramos colaterais de axônios não lesados e a remodelação da circuitaria do sistema nervoso em relação às perdas funcionais. A plasticidade das conexões centrais compensa funcionalmente a falta da especificidade na reinervação dos órgãos alvo; a plasticidade neural em humanos tem um efeito limitado na localização sensorial e no controle motor fino, e pode mesmo resultar em alterações mal adaptativas tais como dor neuropática, hiperreflexia e distonia (Navarro et al., 2007).

### **1.8 Aspectos Fisioterapêuticos no Trauma**

A capacidade de recuperação das assimetrias motoras depende do grau de supressão do uso do segmento corporal acometido (Nudo et al 1996).

A experiência comportamental específica e o treinamento por meio de movimentos orientados a tarefas resultam em modificação dos mapas corticais e promovem recuperação funcional (Ward et al., 2003). Este tipo de tratamento pode promover adaptações na circuitaria neuronal na proximidade da lesão, e esta reorganização pode contribuir com a recuperação da função motora comprometida (Biernaskie & Corbett, 2001).

A medida que ocorre a execução dos movimentos envolvidos no treino ocorre uma modificação da conectividade da rede neuronal correspondente (Adkins et al., 2006).

As adaptações são diretamente relacionadas à síntese de proteínas (Hernandez et al., 2006), relacionando-se ainda com a efetividade sináptica, com o número de sinapses (Kleim et al., 1998) e com distintas mudanças na representação cortical dos segmentos corporais treinados (Monfils et al., 2005).

Em primatas e roedores, foi comprovado que no decorrer do treino há desenvolvimento de plasticidade sináptica adaptativa em regiões corticais envolvidas nas tarefas, isto indica a existência de uma relação entre a plasticidade sináptica e a continuidade do treinamento (Vasquez et al., 2004).

A reorganização dos mapas corticais está associada a grupos musculares que são recrutados durante a tarefa de treinamento, porém não na mesma proporção em que ocorre o aumento da atividade muscular, como é o caso das tarefas de atividades repetitivas (Graziano et al., 2006).

O treinamento em humanos e em animais está fundamentado no re-treinamento de atividades funcionais por meio da inter-relação multisistêmica, músculo-esquelética, da sensorial e da cognitiva. Estudos de neuroimagem em casos controle de lesão cortical sensório-motora ipsilateral, mostram aumento da atividade cortical no local da lesão e redistribuição em múltiplas áreas da rede sensório-motor. Estes são os ganhos funcionais obtidos por meio do treinamento motor (Schaechter, 2004).

Os fatores biológicos e ambientais que influenciam a recuperação funcional das lesões sensório-motoras e o padrão para reabilitação motora possuem variabilidades individuais. Evidências demonstram que a escolha adequada e a execução da atividade motora fornecem melhores resultados terapêuticos (Michaelsen et al., 2006).

A cronicidade, intensidade e precocidade no início do tratamento de reabilitação são fatores essenciais para a recuperação funcional sensorio-motora (Huang et al., 2009).

Quando ocorre um traumatismo cortical, na região afetada existe sinaptogênese, aumento de síntese protéica e reorganização de mapas corticais (Adkins et al., 2006).

A capacidade de modificações das sinapses e dos circuitos neuronais em função da atividade possui relação direta com a recuperação motora das funções comprometidas ou perdidas (Cauraugh & Summers, 2005).

## **2. HIPÓTESE DO TRABALHO**

Diversos trabalhos com modelos animais de treinamento motor para o tratamento de lesões nervosas periféricas já foram realizados.

Todavia, ainda é desconhecido o efeito do treinamento aeróbico precoce em esteira ergométrica após a segmentectomia do fascículo lateral do plexo braquial.

A hipótese do presente trabalho é de que o exercício aeróbico precoce em esteira aplicado pode promover crescimento axonal nos cotos, proximal e distal, do fascículo lateral do plexo braquial após segmentectomia.

Neste contexto, os resultados obtidos no presente trabalho fornecem dados que, futuramente, poderão servir de subsídio para pesquisas das lesões do plexo braquial.



### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

O objetivo geral do estudo é realizar a análise morfológica dos cotos proximal e distal do fascículo lateral do plexo braquial após estes animais serem submetidos a segmentectomia neste fascículo e treinamento aeróbico precoce em esteira por seis semanas.

#### Objetivos Específicos

-Realizar análise quantitativa, mediante emprego do método estereológico para contagem de área-ponto (cálculo da área axonal), em cotos proximal e distal do fascículo lateral do plexo braquial de ratos adultos, machos, submetidos à manipulação ou segmentectomia deste fascículo e treinamento aeróbico em esteira por seis semanas.

-Realizar análise quantitativa, mediante emprego do método estereológico para contagem dos axônios dos cotos neurais por  $\mu\text{m}^2$  (cálculo da densidade axonal), em cotos proximal e distal do fascículo lateral do plexo braquial de ratos adultos, machos, submetidos à manipulação ou segmentectomia deste fascículo e treinamento aeróbico em esteira por seis semanas.

-Realizar análise quantitativa, mediante emprego do método estereológico para o cálculo da espessura da bainha de mielina dos axônios nos cotos proximal e distal do fascículo lateral do plexo braquial de ratos adultos, machos, submetidos à manipulação ou segmentectomia deste fascículo e treinamento aeróbico em esteira por seis semanas.

-Realizar acompanhamento temporal da recuperação motora durante o período de treinamento, mediante utilização de testes de funções motoras (*Narrow Beam, FootFault, Cylinder, Hanging Wire*) nos ratos submetidos à manipulação e secção do fascículo lateral do plexo braquial e treino aeróbico por quatro semanas em esteira.

#### **4. MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO**

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF NEURAL STUMP OF THE LATERAL FASCICULUS OF THE BRACHIAL PLEXUS OF WISTAR RATS AFTER SEGMENTECTOMY AND AEROBIC EXERCISE TRAINING

#### 4.1 ARTIGO

### **Morphological analysis of neural stump of the lateral fasciculus of the brachial plexus of Wistar rats after segmentectomy and aerobic exercise training**

Fernando Soares Camelier, <sup>1,2</sup>, Juliana Dalibor Neves <sup>1,2</sup>, Sandro Antunes da Silva <sup>1,2</sup>,  
Alexandre da Silva Costa<sup>2</sup>, Nígia Ramalho Arsego<sup>2</sup>, Guilherme Coelho<sup>2</sup>,  
Leder L. Xavier, PhD <sup>1,3</sup>, Maria Cristina Faccioni-Heuser, PhD <sup>1,2</sup>

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

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

3 Laboratório de Morfologia, Instituto de Biociências Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

O presente artigo será submetido à revista científica “*Nerve and Muscle Journal*”.

**Abstract**

Twenty-eight adult male Wistar rats were assembled at random into five groups: Control, Sham sedentary, Sham trained, Lesion sedentary and Lesion trained. Functional tests combined with measurements of the fiber area, axonal density and myelin sheath thickness of the proximal and distal stumps were used for morphological analysis. In the functional tests before treadmill training we observed that lesion-sedentary and lesion-trained groups demonstrated statistically significant differences when compared to the control, sham-sedentary and sham-trained groups ( $p < 0.05$ ); Furthermore, in the first week of treadmill training we observed similar differences between the lesion-sedentary group and the control, sham-sedentary and sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) and the lesion-trained group and the lesion-sedentary group ( $p < 0.05$ ) while the morphological analysis of the lesion-trained group showed such differences with the lesion-sedentary group ( $p < 0.05$ ). We conclude that treadmill training after segmentectomy of lateral fasciculus promotes neural recuperation.

**Keywords:** neural recuperation, lateral fasciculus, brachial plexus, segmentectomy, treadmill training.

## Introduction

Five hundred thousand new cases of peripheral nerve traumatic lesions resulting in partial or total loss of motor, sensorial and autonomic functions occur worldwide each year and it is reported that 14% are in the superior member and that 10% of these affect the brachial plexus<sup>1234</sup>.

Many researchers have shown that the proprioceptive aerobic exercises - motor coordination and equilibrium exercise training - are very important for the rehabilitation of peripheral nerve lesions, because these exercises can correct the proprioceptive deficit and help the patient to recover the ability to maintain orientation and stability during static and dynamic activities<sup>1356</sup>.

Such physical exercises have produced significant improvements of motor activities which can be verified by progressive decreases in the number of errors during the activities proposed with control rats<sup>1578</sup>.

Recent studies have demonstrated that the aerobic exercise training promotes an increase of neurotrophins<sup>9</sup> and that these are necessary to control the regeneration index after the peripheral nerve lesion<sup>10</sup>.

The results of studies with electrical stimulation and neurotrophins in peripheral nerve lesions are promising. For example, if a proximal stump of a segment of peripheral nerve is stimulated for a period of 1 hour during the surgical treatment, the axonal regeneration is activated<sup>111213</sup>.

When a peripheral nerve lesion occurs, the cutaneous afferent information of the member is essential for controlled movements, and its loss contributes to the postural functional deficit <sup>7</sup>. The central nervous system responds to muscles, ligaments, tendons, articular sheaths and cutaneous receptors in order to produce an effective motor response to the postural adjustment in the locomotion. In addition, visual, vestibular and somatosensorial information plays an important role in maintaining the dynamic postural control<sup>8</sup>, and the central nervous system depends on such mechanisms of sensorial feedback to ensure a perfect motor performance. Loss of this feedback process causes the respective functional deficit <sup>14</sup>.

Aerobic exercise training is widely used to improve the motor function of spinal lesions both in animal models and in clinical trials, but its effect on the recuperation of peripheral nervous lesions has received less attention and there is little direct evidence of the effects of aerobic exercise training on the axonal regeneration of lesions <sup>15</sup>.

The objective of this study is to verify the effects of aerobic exercise training on the morphology of proximal and distal stumps of the brachial plexus after segmentectomy.

## **Materials and Methods**

Twenty-eight male Wistar adult rats each 12 months of age and weighing between 480g to 680g, obtained from the Health Basic Science Institute (HBSI) were studied.

The rats were kept in standard Plexiglas boxes, under a 12:12 h light/dark cycle in a temperature-controlled environment ( $20 \pm 1$  °C) with food and water ad libitum. The procedures were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio

Grande do Sul and all the animals were handled in accordance with Brazilian law. Animals were randomly divided into five groups: Control (C) with five animals that were neither submitted to surgery or trained; Sedentary sham (SS) with six animals that were submitted to surgery without segmentectomy and without training ; Sham trained (ST) with five animals that were submitted to surgery without segmentectomy and with training ; Lesion sedentary (LS) with six animals which were submitted to surgery (segmentectomy) but were not trained; Lesion trained (LT) with six animals which were submitted to segmentectomy and were trained. Before the surgical procedures, the animals were adapted for 5 days to the training program. For the surgery, the animals were anesthetized using ketamine and xylazine (90 and 15 mg/kg, i.p., respectively; Vetbrands, Brazil) and the right lateral fasciculus was exposed through a skin incision in the axillopectoral region. The right pectorals major muscle was exposed taking care to preserve the cephalic vein on the same side. In order to confirm we were indeed working on the lateral fasciculus of the brachial plexus, we performed a mechanical stimulation to check the contraction of the muscles of the innervated region. In the median portion of lateral fasciculus, we sectioned and removed a 1mm piece of nervous tissue (segmentectomy), leaving the proximal and distal stumps face to face in the anatomical site of the lateral fascicule. The muscle and skin were then closed with 4-0 nylon sutures (Somerville, Brazil), and the animals were put in their cages to rest. Four days after the surgery, the animals from the ST and LT groups began specific training for 6 weeks, while the C, SS and LS groups were placed in the same location as the training animals for a few minutes in order to equalize as much as possible the handling of all groups, but they did not perform any kind of motor activity.

The animals were adapted to the treadmill during four days with a velocity of 5m/min for 10 minutes. The speed was accelerated every 3 minutes. The maximum velocity was defined as the speed where the animals could no longer keep pace. The aerobic treadmill exercise training was performed at 60% of the maximum velocity<sup>1 8 9</sup>. The training began on the fifth day after surgery and functional tests were performed once a week, on the sixth day when there was no training. On the seventh day the animals rested.

During training, the animals underwent the following behavioral assessments: *Narrow Beam test*<sup>16</sup>(NB), *Foot-Fault test*<sup>17</sup>(FF), *Cylinder test*<sup>18</sup> (CYL) and *Hanging Wire*<sup>19 20</sup>(HW). For NB, FF and CYL, the animals were video recorded three times from a lateral angle, and once for HW.

Two days after the period of training the animals were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.; Cristália, Brazil), injected with 1000 IU heparin (Cristália, Brazil) and were transcardially perfused with 300 ml of saline solution, followed by 2.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO) and 2% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4, PB) at room temperature. Two 2 mm segments each of the proximal and distal stumps of the right lateral fasciculus were rapidly excised. The specimens were post fixed by immersion in the same fixative solution at 4 °C until processed; the samples were then washed in 0.1 M PB and postfixed in 1% OsO<sub>4</sub> (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO) in 0.1 M PB for 30 min.; washed again in 0.1 M PB; dehydrated in a graded series of acetone, embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland) and polymerized at 60° C. Cross-semi-thin sections of 1 µm were obtained using an ultramicrotome (MT 6000-XL, RMC, Tucson, AZ) and stained with 1% toluidine blue (Merck, Germany) in a 1% sodium tetraborate (Ecibra, Brazil). Afterwards, images of the proximal and distal portions of the right lateral fasciculus were captured and digitalized



using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Japan) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and processed with Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA) . For morphometric evaluation, both portions of the proximal and the distal stumps of the right lateral fasciculus were analyzed separately - a set of 5 images was chosen using random sampling of four slices of each portion. Two days after the period of training the animals were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.; Cristália, Brazil), injected with 1000 IU heparin (Cristália, Brazil) and were transcardially perfused with 300 ml of saline solution, followed by 2.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO) and 2% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4, PB) at room temperature. Two segments of 2 mm, each one, of proximal and distal stump of the right lateral fasciculus were rapidly excised. The specimens were postfixed by immersion in the same fixative solution at 4 °C until processed; after that, the samples were washed in 0.1 M PB and postfixed in 1% OsO<sub>4</sub> (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO) in 0.1 M PB for 30 min.; washed again in 0.1 M PB; dehydrated in a graded series of acetone, embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland) and polymerized at 60° C. Cross-semithin sections of 1 µm were obtained using an ultramicrotome (MT 6000-XL, RMC, Tucson, AZ) and stained with 1% toluidine blue (Merck, Germany) in 1% sodium tetraborate (Ecibra, Brazil). Afterwards, images of the proximal and distal portions of the right lateral fasciculus were captured and digitalized using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Japan) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and processed with Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA) . For morphometric evaluation both portions, the proximal and the distal stumps of the right lateral fasciculus were analyzed separately, a set of 5 images was chosen using random sampling of four slices of each portion.

Morphometric measurements of the lateral fasciculus stumps included the average myelinated fiber area ( $\mu\text{m}^2$ ) (FA), the myelinated axon density (AD) (number of fibers/ $\mu\text{m}^2$ ) and the average myelin sheath thickness ( $\mu\text{m}$ ) (MS).

The average of FA was obtained by using the virtual square method with  $3.3380 \mu\text{m}^2$  of area counting the points corresponding to the area-point inside each axon but omitting the points that line the myelin sheath. The total number of points counted was multiplied by  $6.78 \mu\text{m}^2$ , the area point <sup>21</sup>.

The average axon density was estimated using the measurement tools of the Image Pro Plus software. The density measurements were made by using the virtual square with  $3.380 \mu\text{m}^2$  of area ( $0.00338 \text{ mm}^2$ ) and only those axons which did not line the inferior and right sides of the same virtual square were counted. To obtain the AD, the number of axons found was divided by  $0.00338 \text{ mm}^2$  <sup>22</sup>.

The MS was measured by determining the myelin thickness in the 10 axons that were chosen in the 4 squares. The average of the values found in each histological slice was measured <sup>23</sup>.

## **Functional Tests**

### *Narrow beam test*

The NB test obliged the animals to walk along a 100-cm long, 2.6-cm-wide surface beam elevated 30 cm above the floor, in order to reach a little dark box at the end of the beam. The number of right forelimb step slips was counted by blinded observer <sup>16</sup>. In this study the animals carried out this test on the 4th postoperative day and weekly thereafter 24 hours after completion of training.

### *Foot – fault test*

The foot-fault test was performed to assess whether acrobatic training enhanced coordinated placement of the forelimbs. Rats were placed on an elevated grid platform (75X20 cm) for 3 trials. They moved across the platform by placing their paws on the rungs of the grid. Errors were measured as slips with the right forelimb through the grid openings<sup>17</sup>. In this study, the animals carried out the test on the 4rd postoperative day and weekly thereafter, 24 hours after completion of training.

### *Cylinder test*

To examine the effect of lateral fasciculus lesion and training on spontaneous forelimb use during exploratory activity movements, animals were individually placed into a transparent cylinder (20 cm diameter and 40 cm high) on a glass tabletop. They were video recorded from below through an angled mirror for 3 min during each test session. The cylindrical shape encouraged rearing and vertical exploration of the walls with the forelimbs. The number of forepaws wall contacts used for postural support was counted and the percentage of asymmetry of single-limb wall contacts [ $(\text{contralateral}/\text{contralateral} + \text{ipsilateral}) \times 100$ ] was calculated - the normal value is 50%. A single cylinder test session was performed 3 and 21 days after the surgery, and one day before perfusion<sup>18</sup>.

### *Hanging wire test*

This task was used as a measure of the ability to grasp the wire and the strength of the forelimbs. The animals used their forelimbs to suspend their body weight on a wire stretched between two bars, 60 cm above the ground and the time (in seconds) before the animal fell was recorded. A score of zero was used if the rat fell down immediately and 120

seconds was the time limit of the test. A single trial was conducted for every rat on each test day<sup>19 20</sup>.

## **Statistical Analysis**

Behavioral assessment was analyzed using repeated measures of analysis of variance while the morphometric measurements of the stumps of lateral fasciculus were analyzed using the one-way variance analysis (ANOVA). All analyses were followed by the Post Hoc Tukey test. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The significance level was  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using a statistical program social sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

## **Results**

### *Narrow beam test*

Before the outset of treadmill training, the NB results demonstrated that the lesion-trained and the lesion-sedentary groups presented significant statistical differences when compared with the control, sham-sedentary and sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) (Fig.1-A). After the first week of treadmill training, we found significant statistical differences between the lesion-sedentary group and the control, sham-sedentary and sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) and we found similar differences between the lesion-trained group and the lesion-sedentary group ( $p < 0.05$ ) (Fig.1-B). Furthermore, from the second week of treadmill training to the end of training, a statistical difference was maintained between the lesion-sedentary group and the control, sham-sedentary and sham-trained

group and between the lesion-trained group and the lesion-sedentary group (Fig.1-C,1-D, 1-E, 1-F,1- G).

#### *Foot – Fault test*

Before the outset of treadmill training, the FF test results demonstrated that the lesion-trained and the lesion-sedentary groups presented statistically significant differences by comparison with the control, sham-sedentary and sham-trained groups, ( $p < 0.05$ ) (Fig.2-A). After the first week of treadmill training, we found that the lesion sedentary group had a statistically significant difference by comparison with control, sham-sedentary and sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) and we found that the lesion-trained group showed a statistically significant differences when compared with the lesion-trained group ( $p < 0.05$ ) ( Fig.2-B). Furthermore, from the second week of treadmill training to the end of training, a statistically significant difference was maintained between the lesion-sedentary group with control, sham-sedentary and sham- trained groups and between the lesion-trained group and the lesion-sedentary group (Fig.2-C,2-D,2-E,2-F,2-G).

#### *Cylinder test*

Before the outset of treadmill training, the CYL test results demonstrated that the lesion-sedentary group presented statistically significant differences when compared with the control, sham-sedentary and sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) and the lesion-trained group had a statistically significant difference by comparison with the sham trained group ( $p < 0.05$ ) (Fig.3-A). During the middle of periodical training, in the third week, the CYL results demonstrate that the lesion-sedentary groups showed statistically significant differences when compared with the control, sham-sedentary and sham-trained

groups ( $p < 0.05$ ) and the lesion-trained group demonstrated statistically significant difference when compared with the lesion-sedentary group ( $p < 0.05$ ) (Fig.3-B). CYL results at the end of periodical treadmill training demonstrate that the lesion-sedentary groups showed statistically significant differences when compared with the control, sham-sedentary and the sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) and the lesion-trained group likewise by comparison with the lesion-sedentary group ( $p < 0.05$ ) (Fig.3-C).

#### *Hanging wire test*

Before the start of treadmill training, the HW test demonstrates that the lesion-trained and the lesion-sedentary groups showed statistically significant differences when compared with the control, sham-sedentary and the sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) (Fig.4 - A). After the first week of treadmill training, the lesion-trained and the lesion-sedentary groups presented statistically significant differences by comparison with the control, sham-sedentary and the sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) (Fig.4-B). Following completion of the second week of treadmill training, we found that the lesion-sedentary group presented statistically significant differences when compared with the control, sham-sedentary and sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) and also that the lesion-trained group showed similar differences by comparison with control, sham-sedentary, sham-trained and lesion-sedentary group ( $p < 0.05$ ) (Fig.4-C). After the third week of treadmill training, the lesion-sedentary groups demonstrated statistically significant differences by comparison with the control, sham-sedentary and sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) and the lesion-trained group statistical differences when compared with the animals of the lesion-sedentary group ( $p < 0.05$ ) (Fig.4-D). From the fourth week of treadmill training until the end of the training, the HW test results demonstrate that the lesion-trained and the lesion-sedentary groups

showed statistically significant different when compared with the control, sham-sedentary and sham- trained groups ( $p < 0.05$ ) (Fig.4-E,F,G).

### **Histological analysis**

Histological analysis of regenerating nerves (Fig.5) showed that was no statistical difference between the C, SS and ST groups. In this groups the proximal and distal stump showed small and large myelinated fibers, minor interstitial space, the endoneurial connective tissue, the Schwann cells and the blood vessels ( Fig.5-A, 5-B, 5-C, 5-D, 5-E, 5-F). However, in the proximal stump from the LS group, we observe the extensive interstitial space with endoneurial connective tissue, the small myelinated fibers, the degenerative debris and the absence of the Schwann cells (Fig.5-G).

The distal stump from the LS group presents the small number of myelinated fibers, the extensive interstitial space with disorganized endoneurial connective tissue, and the absence of the Schwann cells and the presence of degenerative debris (Fig. 5-H).

In the proximal stump from the LT group, we note the bimodal fiber spectrum, the large and the small myelinated fibers and the smaller interstitial space, the endoneurial connective tissue, the Schwann cells and the blood vessels (Fig. 5-I) – while in the distal stump from the same group we observe the presence of bimodal fiber spectrum of myelinated fibers, the small interstitial space, endoneurial connective tissue and the Schwann cells but not the blood vessels (Fig. 5-J).

### *Fiber Area*

The measurements of the FA from the proximal stump demonstrate that the lesion sedentary group presented statistically significant differences by comparison with the control, sham-sedentary, sham-trained and lesion-trained groups and that the lesion-trained group demonstrated statistically significant differences when compared to the lesion-sedentary group ( $p < 0.05$ )(Fig 6-A).

The FA measurement taken from the distal stump demonstrate that the lesion-sedentary group showed statistically significant difference by comparison with the control, sham-sedentary, sham-trained and lesion-trained groups, and that the lesion-trained group presented the same kind of differences when compared with the lesion-sedentary group ( $p < 0.05$ )(Fig.6-B).

### *Axonal Density*

The AD measurements from the proximal stump demonstrate statistically significant differences when compared with the control, sham-sedentary and sham-trained groups, likewise the lesion-trained group in comparison with the lesion-sedentary group, and the sham-trained group by comparison with the control group ( $p < 0.05$ ) (Fig.7-A). The measurements from the distal stump show that the lesion-sedentary group had statistically significant differences by comparison with the control, sham-sedentary and sham-trained groups ( $p < 0.05$ ) and the lesion-trained group likewise when compared with the lesion-sedentary group ( $p < 0.05$ ) (Fig.7-B).



### *Myelin Sheath*

The MS measurements in the axons from the proximal stump demonstrate that the lesion-sedentary group had statistically significant differences by comparison with the control, sham-sedentary, sham-trained and lesion-trained groups ( $p < 0.05$ ) (Fig.8-A), while those from the distal stump show that the lesion-sedentary group had similar differences in comparison with the control, sham-sedentary, sham-trained and lesion-trained groups ( $p < 0.05$ ) (Fig.8-B).

### **Discussion**

In our study we demonstrated the effects of the aerobic exercise training after a segmentectomy of the lateral fasciculus of the brachial plexus. In the NB, there was recuperation of the motor coordination, conscious proprioception and epicritic tact, these results are in agreement with other reports in the literature<sup>16 17</sup>. In the FF we found recuperation of the motor coordination and again, this result agrees with those observed by others authors<sup>17</sup>.

In the CYL pre-training test trial, the lesion-trained group demonstrated statistically significant differences when compared with the control group - this is due to the exploratory capacity of the Wistar rats and is in accordance with other published reports<sup>18</sup>. In the other CYL trials - when compared to the other groups - functional improvement of the lesion-trained group was observed - this result demonstrates recovery of the conscious proprioceptions and the protopathic tact caused by the development of the stumps.

However, in the HW trial we found no improvement in the strength of the asymmetric muscle force, which indicates that the treadmill training did not promote

changes in the asymmetric force of the member. Again, this is in agreement with other published research<sup>19 20</sup>.

The continuous activity in the training groups produced axonal development as shown by the results of the FA, AD and MS test trials of the lesion-trained as compared to the lesion-sedentary group in the proximal stump. This is because the lesion-trained peripheral nerves associated with the motor-sensorial activities develop after the lesion, and the improvement in motor activity, with some losses, affects the axonal proliferation and development. Once again, this agrees with the results reported in the literature<sup>17 27 28 29</sup>.

As regards the distal stump, the results of the FA, AD and MS suggest that the training affects the axonal proliferation, development and encourages the growth of alternative motor neuron projections independent of the cutaneous routes, when the contact via the normal operational organ is interrupted<sup>30 31</sup>. That is, the improvement could be explained by the development of aberrant distal connections.

In addition, there are studies that show motor neuron's projections formed by muscles and cutaneous routes. Depending on the surgical models, the original Schwann cell's population maintains the muscle's projections in order to maintain the specific molecular identity which can be reorganized by regeneration of the motor neuron<sup>31</sup>.

Furthermore, there are studies demonstrating that the neuron connection to the motor follows both muscle and cutaneous pathways. Depending on the surgical procedure used, the original Schwann cell population maintains the muscle projection so as to conserve the specific molecular identity until it can be reorganized by the regeneration of the motor neuron<sup>32 33 34</sup>.

According to Brushart<sup>31</sup> "The molecular mechanisms underlying preferential pathway projections in the rodent nerve model remain largely unknown. Two schools of

thought have emerged. One is that the Schwann cells of the respective pathways maintain a specific molecular identity that can be recognized by regenerating motor axons, and the other (favored by us) is that regenerating motor axons assess the relative levels of trophic support in each pathway and preferentially remain in the one that provides the greater amount of support; a general process that has previously been termed trophomorphism”.

Related studies have found that in the mouse nerve model motor neurons sprout and maintain more collateral axons in a no-end-organ surgical preparation comparable to one allowing interaction with the end-organs of muscle and skin <sup>35</sup>. The idea of trophomorphism is that when a motor neuron is able to more clearly define a difference in the level of trophic support it will be more likely to withdraw axon collaterals that project to pathways with lower levels of trophic support, thus relieving the energy burden of maintaining multiple axons collaterals. The preference of motor neurons to project axons exclusively to the muscle pathway may be significantly accelerated temporally. Then the number of motor neurons projecting simultaneously to both pathways would be significantly reduced <sup>36</sup>.

The recovery of function following peripheral nerve lesions is guiding axons back to their original target end-organs. The nerve splits into two comparable terminal pathways: one to the muscle and the other to the skin. Normally, motor neurons only innervate the pathway to the muscle, but after the parent nerve is repaired regenerating motor neurons are often misrouted to the skin. When the muscle and skin pathways remain connected to their respective targets after the parent nerve is repaired, reinnervation favors the muscle pathway. If contact with the muscle instead is prevented, reinnervation favors the pathway to the skin <sup>37</sup>. When the cutaneous terminal nerve branch was enlarged, motor

neuron projections significantly favored this inappropriate pathway during early time points of regeneration.

These facts suggest that regenerating motor neuron projections are not determined by inherent molecular differences between distal terminal nerve branches themselves. Rather, there is a two-step process that shapes motor neuron reinnervation accuracy. Initial outgrowth choices made by motor axons at the transection site are proportional to the relative amount of target nerve associated with distal nerve axons that previously projected to each of the terminal nerve pathways<sup>38</sup>.

Secondly, the likelihood of axon collateral from a motor neuron remaining in either terminal nerve branch is based upon the relative trophic support provided to the parent motor neuron by the competing terminal pathways and/or end-organs<sup>38</sup>. The aerobic training suggests that there was an induction of the neural regeneration of the proximal stump and this result is in agreement with findings from other studies indicating the role and effect of exercises on such regeneration, particularly as they are activity-dependent processes<sup>17</sup>.

The aerobic exercise training over a period of six weeks promoted an axonal growth of proximal stump and functional recuperation. However, this disagrees with others studies that show that short-time aerobic training at high speed increases the length of the axonal extension<sup>39 40</sup>.

Not with standing that peripheral neural structures in adult animals are stable when morphologically established, the nervous terminations can be often modified and/or affected by functional demands<sup>41 42 43</sup>, - this may explain the development of the distal stump.

The results in our study agree with others in the literature which provides evidence that physical activities induce remodeling of the morphology and the electrophysiology of neural motors projections<sup>41</sup>.

Our results were important because they corroborate that aerobic exercise training induces an increase of axonal density, fiber area and thickness of the proximal stump myelin sheath, and may be an alternative treatment for peripheral nervous lesion.

Regarding the distal stump, we were not able to determine if the axonal growth or development of collateral or aberrant projections really occur. A second study of a larger sample group, using immunohistochemicals and electron microscopy would be required to clarify this question.

We conclude that aerobic exercise training promotes axonal growth in the proximal stump and that the type of lesion inflicted caused motor deficit which can, however, be recuperated by precocious aerobic exercise training.

### **Abbreviations**

AD.....	Axonal Density
C .....	Control group
CYL.....	Cylinder Test
FA.....	Fiber area
FF.....	Foot-fault Test
HW.....	Hanging Wire Test
LS.....	Lesion sedentary group
LT.....	Lesion trained group
MS.....	Myelin Sheath

NB.....	Narrow Beam Test
SS.....	Sham sedentary group
ST.....	Sham trained group
1 W.....	First week of treadmill training
2 W.....	Second week of treadmill training
3 W.....	Third week of treadmill training
4 W.....	Fourth week of treadmill training
5 W.....	Fifth week of treadmill training
6 W.....	Sixth week of treadmill training

## References

1. Rodriguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discov. Today* 2004;**1**:177-185.
2. Midha R. Epidemiology of brachial injury in a multitrauma population. *Neurosurgery* 1997;**40**(6):1182-8.
3. Dubuisson A, Kline DG. Brachial plexus injury : a survey of 100 consecutive cases from a single service . *Neurosurgery* 2002;**51**(3):673-82.
4. Flores PL. Epidemiological study of the traumatic brachial plexus injuries in adults. *Arq Neuro Psiquiatr* 2006;**64**(1):26-39.
5. Seddon HJ. *Surgical of Peripheral Nerves* , 2 nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1975.
6. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration . *Annu Rev Neurosci* 1990;**13**: 43-60.

7. Varejão AP, Filipe VM. Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion in rats. *Behav. Brain Res.* 2007;**176**:193-198.
8. Gauchard GC, Jeandel C, Tessier A, Perrin PP. Beneficial effect of proprioceptive physical activities on balance control in elderly human subjects. *Neurosc. Letters* 1999; **273**:81-84.
9. Berchtold NC, Chinn G, Chou M, Kessler JP, Cotman CW. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience* 2005;**133**:853-867.
10. English AW, Meador W, Carrasco DI. Neutrophin-4/5 is required for the early growth of regeneration axons in peripheral nerves. *Eur J. Neurosci* 2005;**21**:2624-2634.
11. Al-Majed AA, Brushart TM, Gordon T. Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral moto-neurons. *Eur. J. Neurosci* 2000;**12**:4381-4390.
12. English AW, Schwartz G, Mulligan AM, Sabatier MJ. Treadmill exercise promotes axon regeneration in peripheral nerves, Soc. Neurosc., Atlanta GA 2006.
13. English AW, Schwartz G, Meador W, Sabatier MJ, Mulligan A. Electrical stimulation promotes peripheral axon regeneration by enhanced neuronal neurotrophin signaling. *Dev. Neurobiol* 2007;**67**(2):158-172.
14. Gandevia SC, Burke D. Does the nervous system depend on kinesthetic information to contralateral limb movements? *Behav. Brain Sci* 1992;**15**:614-632.
15. Hutchinson KJ, Gomez-Pinilla F, Crowe MJ, Ying Z, Basso DM. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain* 2004;**127**:1403-1414.

16. Lezcano LB, Pedre LCL, Verdecia CIF, Sanchez TS, Fuentes NP, Turner LF. Convenience of the traversal beam test modified to evaluate the model of Parkinson's disease in rat lesioned in SNPC. *J. Cell An. Biol.* 2009;**3**(9):145-151.
17. Jones TA, Chu CJ, Grande LA, Gregory A D. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adults rats. *J. Neurosc.*1999;**19**:10153-10163.
18. Schallert T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *Neuro Rx* 2006;**4**:497-504.
19. Hattori K , Lee H , Crain BJ, Traystmann J, DeVries AC. Cognitive Deficits After Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Stroke* 2000;**31**:1939-1944.
20. Zhang I, Haraguchi S, Koda T, Hashimoto K, Nakagawara A. Muscle atrophy and motor neuron degeneration in human NEDL1 transgenic mice. *J. Biomed Biotech.* 2011;**1**:1-7.
21. Paschoal-Font A, MerchantA, Maranillo E , Brillas A ,Sanudo JR, Valderrama-Canales FJ. Morphometry of the recurrente laryngeal nerves of the rat. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1981;**91**:383-389.
22. Barkmeier JM, Luschei ES. Quantitative analysis of the anatomy of the epineurium of the canine recurrent laryngeal nerve. *J Anat* 2000;**196**:85-101.
23. Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Cunha C, Deonizio JMD, Neto CA, Achaval M. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substance nigra pars compacta and in the ventral segmental area. *Brain Res. Protocols* 2005;**16**:58-64.
24. Duff SV. Impact of peripheral nerve injury on sensorimotor control. *J Hand Ther* 2005;**18**:277-91.



25. Gutmann E, Jakoubek B. Effect of increased motor activity on regeneration of the peripheral nerve in young rats . *Physiol Bohemoslov* 1963;**12**:463-68.
26. Van Meeteren NL, Brakke JH, Helders PJ, Gispen WH. The effect of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J Peripher Nerv Syst* 1998;**3**:277-82.
27. Van der Kooi NL, Lindeman E, Reiphagen I. Strength training and aerobic exercise training for muscle disease. *Syst Rev* 2005;**1**:276-291.
28. Bertelli JA, Ghizoni MF. Concepts of nerve regeneration and repairs applied to brachial plexus reconstruction. *Microsurgery* 2006;**26**:230-244.
29. Madison RD, Sofroniev MV, Robinson GA. Schwann cell influence on motor neural regeneration accuracy. *Neuroscience* 2009;**163**:213-221.
30. Zelena J, Jimonova I, Liebermann AR. Reinnervation of transplanted Paccinian corpusculous by ventral root axon: ultrastructure of the regenerated nerve terminals. *J Neurocytol* 1990;**19**:962-969.
31. Brushart TM, Gerber J, Kessens P, Chen YG, Royall RM. Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. *J Neurosci*.1998; **18**(21):8674-8681.
32. Hoke A, Redett R, Hameed H, Jari R, Zhou C, Li ZB, Griffin JW, Brushart TM. Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration. *J Neurosci*. 2006; **26**(38):9646–9655.
33. Brushart T M. Preferential motor reinnervation: a sequential double-labeling study. *Res. Neurol Neurosci*.1998;**1**:281–287.
34. Crutcher KA, Saffran BN. Developmental remodeling of neuronal projections: evidence for trophomorphism? *Comm. Dev. Neurobiol* 1990;**1**(2):119–141.

35. Witzel C, Rohde C, Brushart TM. Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J Comp Neurol* 2005;**485**(3):183–190.
36. Redett R, Jari R, Crawford T, Chen YG, Rohde C, Brushart TM. Peripheral pathways regulate motoneuron collateral dynamics. *J Neurosci* 2005;**25**(41):9406–9412.
37. Uschold T, Robinson GA, Madison RD. Motor neuron regeneration accuracy: balancing trophic influences between pathways and end-organs. *Exp. Neurol* 2007;**205**(1):250-256.
38. Robinson G, Madison RD. Influence of terminal nerve branch size on motor neuron regeneration accuracy. *Exp. Neurology* 2009; **215**(2):228-235.
39. Marqueste T, Alliez JR, Alluin O, Jammes Y, Decherchi P. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. *J Appl Physiol* 2004;**96**:1988-95.
40. Sabatier MJ, Redmon N, Schwartz G, English A W. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. *Exp. Neurol* 2008;**211**:489-93.
41. Deschenes MR, Maresh CM, Crivello JF, Armstrong LE, Kraemer WJ, Covault J. The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology. *J Neurocytol* 1993;**22**:603-15.
42. Tomas J, Santafé M, Lanuza MA, Fenoll-Brunet MR. Physiological activity-dependent ultrastructural plasticity in normal adult rat neuromuscular junctions. *Biol Cell* 1997;**89**:19-28.
43. Nishizawa T, Yamashita S, McGrath KF, Tamaki H, Kasuga N, Takekura H . Plasticity of neuromuscular junction architectures in rat slow and fast muscle fibers following temporary denervation and reinnervation processes. *J Muscle Res Cell Motil* 2006; **27**:607-15.

## Legends

Fig 1. Comparison of the NB. Pre-training (A) data expressed a significant difference between the LS and LT groups with the C, the SS and the ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$ . In one week of training (B) data expressed a significant difference between the LS group with the C, SS and the ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT and LS groups <sup>d</sup>  $p < 0.05$ . The following weeks (C,D,E,F, G) data expressed a significant difference between the LS group with the C, the SS, ST <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT group with the LS group <sup>d</sup>  $p < 0.05$ .

Fig 2. Comparison of FF. Pre-training (A) data expressed a significant difference between the LS and LT groups with the C, the SS and the ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$ . In one week of training (B) data expressed a significant difference between the LS group with the C, the SS the ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT group with the LS group <sup>d</sup>  $p < 0.05$ . The following weeks (C,D,E,F,G) data expressed a significant difference between the LS group with the C, the SS, the ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT with the LS group <sup>d</sup>  $p < 0.05$ .

Fig 3. Comparison of CIL Pre-training (A) data expressed a significant difference between the LS group with the C, SS, and ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT with the ST groups <sup>c</sup>  $p < 0.05$ . In the third week of training (B) data expressed a significant difference between the LS group with the C, the SS, the ST

groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT and the LS groups <sup>d</sup>  $p < 0.05$ . In the sixth week of training (C) data expressed a significant difference between the LS group with the C, SS, ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT and the LS groups <sup>d</sup>  $p < 0.05$ .

Fig 4. Comparison of HW. Pre-training (A) data expressed a significant difference between the LS and the LT groups with the C, the SS and the ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$ . In one week of training (B) data expressed a significant difference between the LS and the LT groups with the C, the SS and the ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$ . In the second week of training (C) data expressed a significant difference between the LS group with the C, SS and ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT group with the C, the SS, the ST and the LS groups <sup>abcd</sup>  $p < 0.05$ . In the third week of training (D) data expressed a significant difference between LS group with the C, the SS, the ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT with the LS groups <sup>d</sup>  $p < 0.05$ . The following weeks (E, F, G) data expressed a significant difference between the LS and LT groups with the C, SS and ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$ .

Fig 5. Digitized images of transverse semithin sections ( $1\mu\text{m}$ ) obtained from lateral fascicle of the brachial plexus. (A, B) Proximal and distal portions, respectively from group C. Both images, note the bimodal fiber spectrum, the large and small myelinated fibers (mf) and the minor interstitial space, the endoneurial connective tissue (\*), the Schwann cells (Sc) and the blood vessels (bv). (C, D) Proximal and distal portions, respectively from SS

group. Note the same bimodal fiber spectrum of myelinated fibers (mf), the large and small fibers, and the same interstitial space, the endoneurial connective tissue (\*), the Schwann cells (Sc) and blood vessels(bv). (E, F) Proximal and distal portions, respectively from ST group. Note the same bimodal fiber spectrum of myelinated fibers (mf) and the same interstitial space with endoneurial connective tissue (\*), the Schwann cells (Sc) and the blood vessels (bv). (G) Proximal stump from LS group. Note the extensive interstitial space with endoneurial connective tissue (\*) and the small myelinated fibers (mf), the degenerative debris (dd) and absence of the Schwann cells (Sc). (H) Distal stump from LS group, note the small number of myelinated fibers (mf), the extensive interstitial space with a endoneurial connective tissue (\*), that is disorganized, absence of the Schwann cells (Sc) and presence of degenerative debris (dd)( Wallerian degeneration). (I) Proximal stump from LT group, note the bimodal fiber spectrum, the large and the small myelinated fibers (mf) and the minor interstitial space, the endoneurial connective tissue (\*), the Schwann cells (Sc) and the blood vessels (bv). (J) Distal stump from LT group. Note the presence of bimodal fiber spectrum of myelinated fibers (mf), and the minor interstitial space , endoneurial connective tissue (\*) and the Schwann cells (Sc). Sections were stained with toluidine blue. Scale bar = 20  $\mu$ m.

Fig 6. Comparison of histological analysis of FA of the proximal stump ( A ) data expressed a significant difference between the LS with the C , SS , ST and LT groups  $^{abce} p < 0.05$  and the LT group with LS group  $^d p < 0.05$ . The FA of the distal stump ( B ) data expressed a significant difference between the LS group with the C, SS , ST and the LT group  $^{abce} p < 0.05$  and a significant difference between the LT group with the SS group  $^b p < 0.05$  .

Fig 7. Comparison of the histological analysis of AD of the proximal stump (A) data expressed a significant difference between the LS group with the C, SS, ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the ST group with the C group <sup>a</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT group with the LS group <sup>d</sup>  $p < 0.05$ . The AD of the distal stump (B) data expressed a significant difference between the LS group with the C, SS, ST groups <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT with the LS groups <sup>d</sup>  $p < 0.05$ .

Fig 8. Comparison of the histological analysis of MS of the proximal stump (A) data expressed a significant difference between the LS group with the C, SS, ST <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and between the LT group with the LS group <sup>d</sup>  $p < 0.05$ . The MS of the distal stump (B) data expressed a significant difference between the LS group with the C, SS, ST <sup>abc</sup>  $p < 0.05$  and a significant difference between the LT group with LS group <sup>d</sup>  $p < 0.05$ .

Figure 1

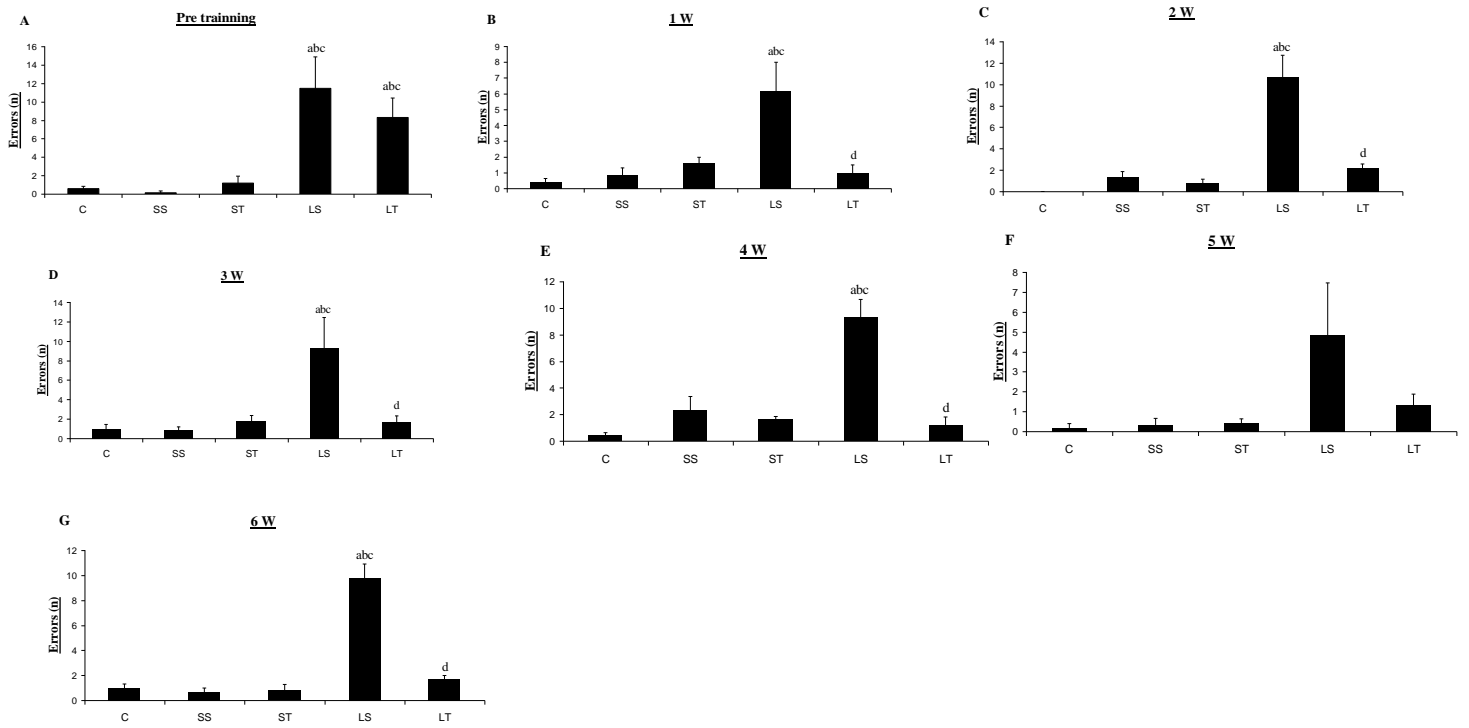


Figure 2

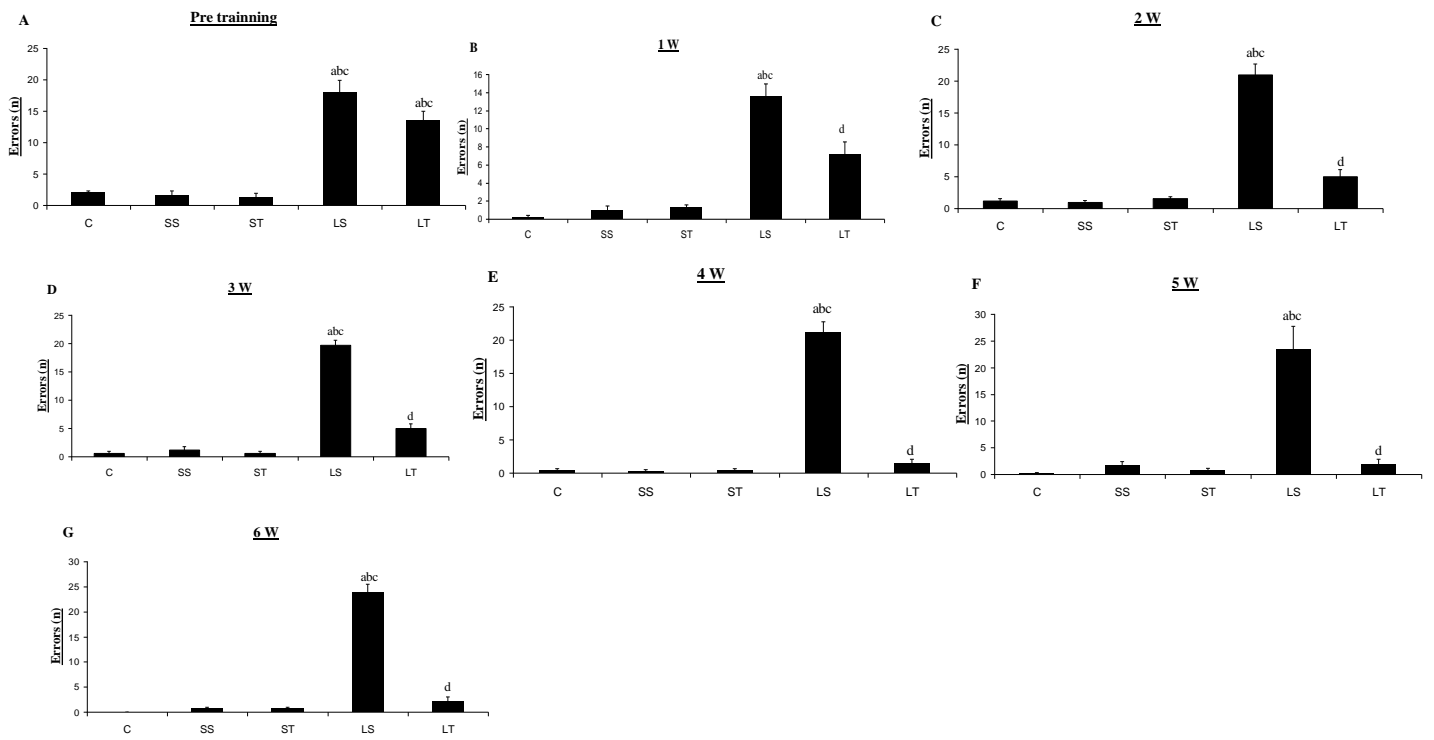




Figure 3

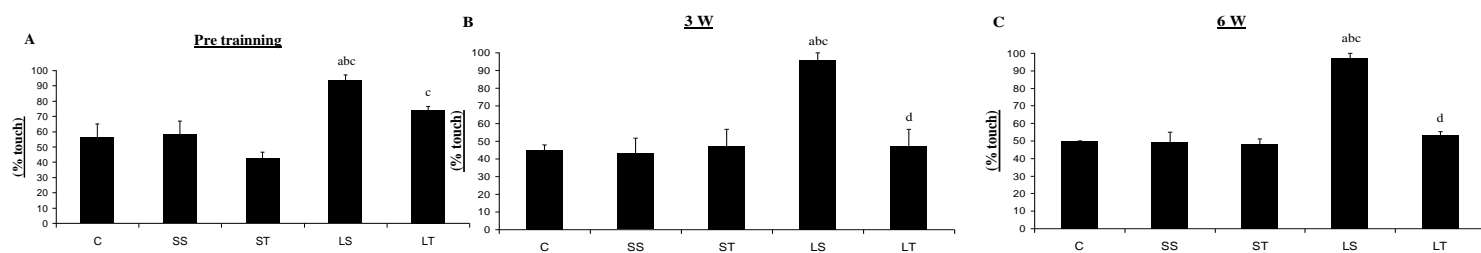


Figure 4

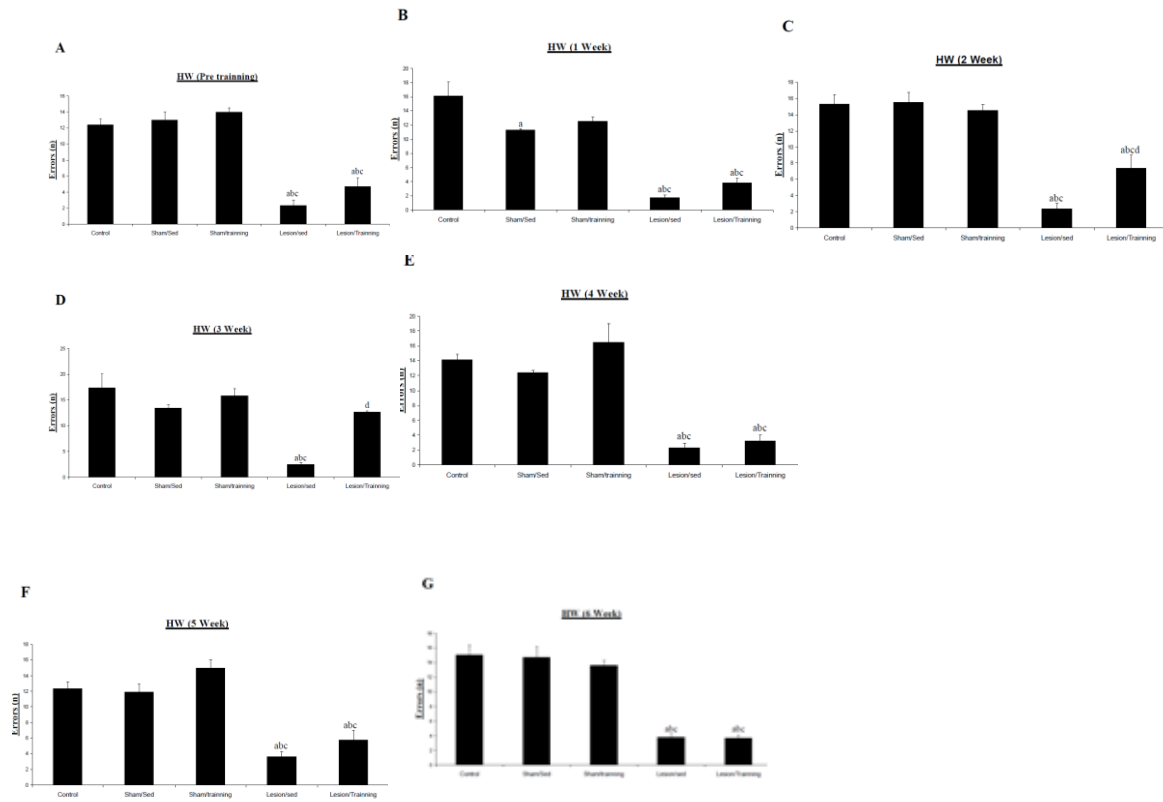


Figure 5

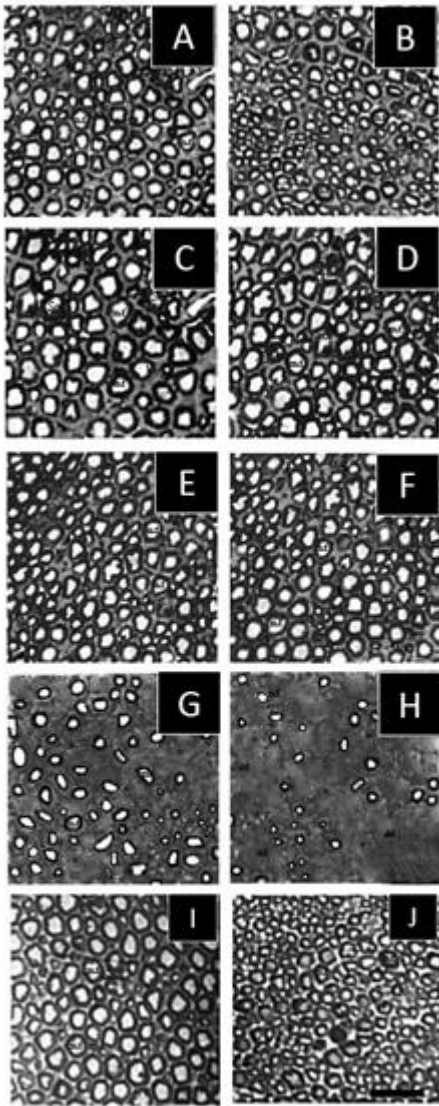


Figure 6

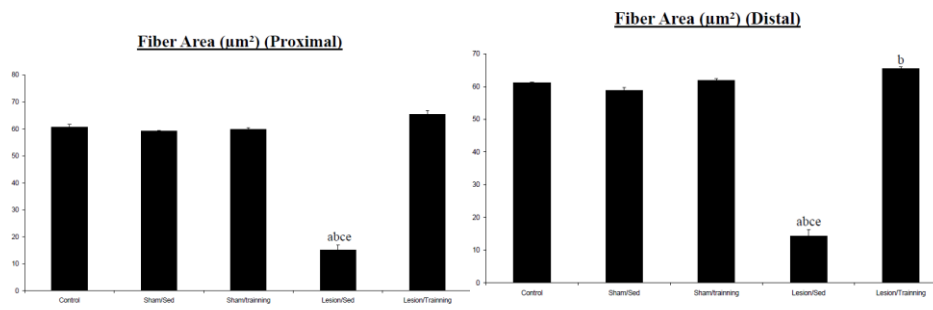


Figure 7

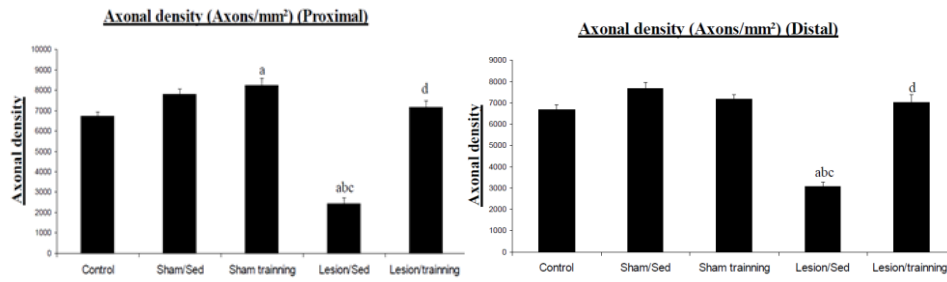
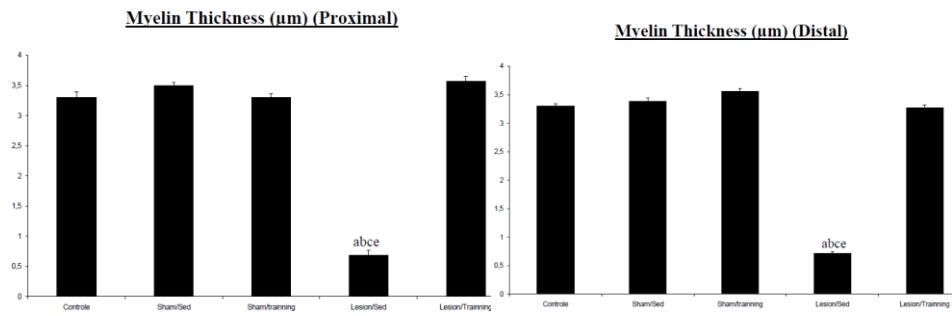


Figure 8 -



## 6- Perspectivas

- Avaliar os efeitos do treinamento aeróbico sobre as fibras musculares da região afetada pela lesão do fascículo lateral.

- Analisar os efeitos da lesão do fascículo lateral sobre neurônios da medula espinhal.

- Analisar a morfologia da musculatura afetada no membro anterior utilizando técnicas que permitam a distinção entre fibras do tipo I e II , identificação de graduação de atrofia e da redução do numero dos tipos de fibras .

- Realizar estudo com microscopia eletrônica dos cotos neurais envolvidos e nas fibras musculares afetadas pela lesão.

- Realizar estudos comparativos entre os tipos de lesões de plexo braquial, crush, ligadura, secção e segmentectomia e avaliar os efeitos do treinamento aeróbico sobre os cotos neurais e a musculatura afetada.

- Realizar estudo imunohistoquímico dos fatores de crescimento neurais envolvidos nos processos de regeneração neural nos níveis de medula espinhal, gânglio nervoso, cotos neurais e musculatura afetada.

## 7. Referências Bibliográficas

1. ADKINS, D.L., BOYCHUCK, J., REMPLE, M.S., KLEIM, J.A. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord. *J Appl Physiol.* **101**: 1776-1782, 2006.
2. ANDERSON, B.J., ALCANTARA, A.A., GREENOUGH, W.T. Changes in synaptic organization of the rat cerebellar cortex. *Neurobiology of Learning and Memory* , **66**: 221-229,1996.
3. BAICHWAL, R.R.; BIGBEE, J.W.; DEVRIES, G.H. Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:1701-1705, 1988.
4. BERTELLI, J.A.; MIRA, J.C.; PLEOT-DECHAVASSINE, M. & SERILLE, A. Selective motor hyperinnervation using motor rootlet transfer . An experimental study in rat brachial plexus . *J Neurosurg* , United States , **87**(1) : 79-84 , jul . 1997.
5. BERTELLI ,J.A., TALEB, M., SAADI, A., MIRA, J.C., PECOT-DECHAVASSINE, M., The rat brachial plexus and its terminal branches: an experimental model for the study of peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* ,**16**:77–85, 1995.
6. BERTELLI ,J.A., GHIZONI, M.F. Concepts of nerve regeneration and repair applied to brachial plexus reconstruction. *Microsurgery*, **26** :230- 244, 2006.
7. BIERNASKIE, J., CORBETT, D. Enriched Rehabilitative Training Promotes Improved Forelimb Motor Function and Enhanced Dendritic Growth after Focal Ischemic Injury. *J Neurosci* **21**: 5272-5280, 2001.



8. BLACK, J.E.; ISSACS, K.R.; ANDERSON, B.J.; ALCANTARA, A.A. & GREENNOUGH, W.T. Learning causes synaptogenesis whereas motor activity causes angiogenesis in cerebellar cortex of adult rat . *Proc Nat Acad Sci* , **87**: 5568-5572, 1990.
9. BONTIOTI, E. ; KANJE, M. ; LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B. End-to-side nerve repair in the upper extremity of rat. *J Peripher Nerv Syst* **10**: 58-68,2005.
10. BONTIOTI, E.; KANJE, M.; DAHLIN, L.B. Regeneration and functional recovery in the upper extremity of rats after various types of nerve injuries . *J Peripher Nerv Syst* **8**: 159-68,2003.
11. BURNETT, M.G.; ZAGER, E.L.Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review.*Neurosurg Focus*. **16**(5):E1,2004.
12. CAURAUCH, H.H., SUMMERS, J.J.Neural platicity and bilateral movements:A rehabilitation approach for chronic stroke. *Prog Neurobiol* **75**: 309-320, 2005.
13. CLARKE, J.; PLOUGHMAN, M.; CORBETT, D.; A qualitative and quantitative analysis of skilled forelimb reaching impairment following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res* **1145**: 204-212,2007.
14. CHU, C.J. & JONES, T.A. Experience-dependent structural plasticity in cortex heterotic to focal sensorimotor cortical damage. *Experimental Neurology* , **166**: 403-414, 2000.
15. CULLHEIM, S.; WALLQUIST, W.; HAMMARBERG, H.; LINDA, H.; PIEHL, F.;CARLSTEDT, T.; RISLING, M. Properties of motoneurons underlying their regenerative capacity after axon lesions in the ventral funiculus or at the surface of the spinal cord. *Brain Res.Rev.* **40**: 309-316,2002.
16. CUP, E.H.; PIETERS, A.J.; TEN-BROEK-PASTOOR, J.M.; MUNNEKE, M.; VAN ENGELEN, B.G.; HENDRICKS, H.T.; VAN DER WILT, G.J.; OOSTERDORP, R.A.

- Exercise therapy and other types of physical therapy for patients with neuromuscular disease: a systematic review. *Arch Phys Med Rehabil* **88**: 1452-64,2007.
17. DAVID, S., AGUAYO, A.J. Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats. *Science* **214**: 931-933, 1981.
  18. DUBUISSON, A.S. & KLINE, D.G.; Brachial plexus injury : a survey of 100 consecutive cases from a single service . *Neurosurgery* , United States , **51**(3): 673-82 , Discussion 682-3, sep. 2002 .
  19. DUFF, S.V. Impact of peripheral nerve injury on sensorimotor control. *J Hand Ther* **18**: 277-91,2005.
  20. FAWCETT, J.W. & KEYNES, R.J.; Peripheral nerve regeneration . *Annu Rev Neurosci* , **13**: 43-60 , 1990 .
  21. FERREIRA, A.S.; Lesões Nervosas Periféricas 1ª ed. Editora Santos , **3** : 31-65 , **4** ::67-88 , 1999
  22. FLORES, P.L.; Epidemiological study of the traumatic brachial plexus injuries in adults. *Arq Neuro Psiquiatr.* **64**(1): mar. 2006.
  23. GANDEVIA, S.C. BURKE, D. Does the nervous system depend on kinesthetic information to contralateral limb movements? *Behav Brain Sci*, **15**:614-632,1992.
  24. GAUCHARD, G.C., JEANDEL, C., TESSIER, A., PERRIN, P.P. Beneficial effect of proprioceptive physical activities on balance control in elderly human subjects. *Neuroscience Letters*, **273**: 81-84, 1999.
  25. GORDON, T.; SULAIMAN, O., BOYD, J.G.; Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst*, **8**: 236-50,2003.
  26. GRAY, H.; Anatomia ; 37a Ed. Guanabara Koogan , **2** (7) : 1066-1074 , 1995
  27. GREEN, E. The Anatomy of the Wistar Rat. Interamericana Edition, 746-778, 1953.

28. HEBER, R.; Anatomy and embriology of the laboratory rat .Northeses , *Biomed Verlag*,1986.
29. HERNANDEZ, P.J., SCHILTZ, C.A., KELLEY, A.E. Dynamic shifts in corticostriatal expression patterns of the immediate early genes homer 1 a and zif268 during early and late phases of instrumental training. *Lern Mem* **13**: 599-608 , 2006.
30. HUANG, H.C., CHUNG, K.C., LAI, D.C., SUNG, S.F. The impact of timing and dose of rehabilitation delivery on functional recovery of stroke patients. *J Chin Med A ssoc.***72**: 257-264, 2009.
31. JOHNSON, E.O.; ZOUBOS,A.B. & SOUCACOS, P.N.; Regeneration and repair of peripheral nerves . *Injury,Int. J. Care Injured* , **36**5: 524-529, 2005.
32. JONES, T.A.; CHU, C.J.; GRANDE,L.A. & GREGORY, A. D.; Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adults rats .*The Journal of Neuroscience* , **19**: 10153-10163, 1999.
33. KLEIN, J.A.; SWAIN, R.A.; CVZERLANIS, C.; KELLY, J.L.; PIPITONE, M.A. & GREENOUGH, W.T.; Learning – dependent dendritic hypertrophy of cerebellar stellate cells: plasticity of local circuit neurons. *Neurobiology of Learning and Memory* , **67**: 29-33, 1997.
34. LASKOWSKIE,R.; NEWCOMER-ANEY,K. & SMITH, J. ; Refining rehabilitation with proprioception training: expedition return to play . *The Phisician Sportsmedicine* , **25**: 89-102,1997.
35. LUNDHOLM, D.; HEUMANN, R.; HENGERER, B.; THOENEN, H. ; Interleukin-1 regulates nerve growth factor synthesis in the non-neuronal cells of the rat sciatic nerve.*Nature* **330**: 658-659,1987.

36. MA, J.; KELIERTH, J.O. & WIBERG, M. ; Early nerve repair after injury of the postganglionic plexus : an experimental study of sensory and motor neuronal survival in adults rats . *Scan J Plast Reconstr Han Surg* , **163**: 92-104, 2007 .
37. MIDHA, R. ; Epidemiology of brachial injury in a multitrauma population .*Neurosurgery*, **40**(6) : 1182-8 , JUN. 1997.
38. MONFILS, M.H., PLAUTZ, E.J., KLEIM, J.A. In search of the motor engram; motor map plasticity as a mechanism for encoding motor experience. *Neuroscientist*, **11**; 471-83, 2005.
39. MUMENTHALER, M. ; Some clinical aspects of peripheral nerve lesions. *Eur Neurol* ,**2** : 257-268 , 1969.
40. MOORE , K. L. & DALLEY, A. F. ; *Anatomia* , Editora Guanabara , 2007 .
41. NAVARRO, X. ; VIVO, M. & VALERO-CABRÉ, A.; Neuronal plasticity after peripheral nerve injury and regeneration .*Progress in Neurobiology* , **82**: 163-201 , 2007
42. NAVIKOV, L.N., WIBERG, M. Delayied lost of spinal motoneurons after peripheral nerve injuries in adults rats: a quantitative morphological study . *Exp Brain Research*, **139**, 216-223, 2001.
43. NETTER , F. ; *Anatomia Humana* , Editora Guanabara , 2008 .
44. NUDO, R.J., WISE, B.M., SIFUENTES, F., MILLIKEN, G.W. Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science*, 272; 1791-1794, 1996.
45. PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H.F. In : The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells. *Phyladelphia : Saunders*, 1976.406 p.

46. RODRIGUEZ, F.J.; VALERO-CABRÉ, A. & NAVARRO, X. ; Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discovery Today : Disease Models* , **1** : 177-185 , 2004.
47. SABATIER, M.J.; REDMON, N.; SCHWARTZ, G.; ENGLISH, A.W. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. *Exp Neurol* **211**: 489-93,2008.
48. SHEN, Z.L., LASSNER, F., BADER, A., BECKER, M., WALTER, G.F., BERGER, A. Cellular activity of resident macrophages during Wallerian degeneration. *Microsurgery*, **20** ( 5 ): 255-61,2000.
49. SAKATA, J.T. & JONES, T.A. ; Synaptic mitochondrial changes in the motor cortex following unilateral cortical lesions and motor skills training in adult male rat . *Neuroscience Letters* , **337** : 159-162, 2003.
50. SCHAECHTER, J.D.; Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke . *Progress in Neurobiology* **73**:61-72,2004.
51. SEDDON, H.J.; A classification of nerve injuries . *Br Med J* , **2** : 237 , 1974.
52. SEDDON, H.J.; Surgical of Peripheral Nerves , 2 nd ed. *Baltimore, Williams & Wilkins* , 1975.
53. SEDDON, H.J.; Three types of nerve injury . *Brain* **66**: 237-288, 1943.
54. SEIDLER, R.D. & MARTIN, P.E.; The effects of short term balance training on the postural control of older adults . *Gait and Posture* , **6** : 224-236 , 1997.
55. SONG, W.D. & LUO, Y.X.; Variation of neurotrophic factors expression in spinal cord and muscle after root avulsion of brachial plexus . *Zhongguo xiv fu Chong Jian Waikexue*, **15**(2) : 77-81 , 2001.

56. SANTOS, A.P. SUAID,C.A., FRAZAN, U.P. & BARREIRA, A.A.; Microscopic anatomy of brachial plexus in Wistar rats. *Anat Rec (Hoboken)* , United States , **290**(5) : 477-85 , may.2007.
57. SUNDERLAND, S. ; A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function *Brain* , **74** : 491-516 , 1952 .
58. SUNDERLAND, S. ; Nerves and Nerve Injuries . *2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh, Churchill Livingstone* 1978 .
59. TERZIS, J.K. & MARACH, H. ; Strategies in the microsurgical management of brachial plexus injuries . *Clin Plast Surg* , **16** : 605 , 1989.
60. VAREJÃO, A.S.P. & FILIPE, V.M. ; Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion in rats. *Behavioral Brain Research* , **176**: 193-201 , 2007.
61. VALERO-CABRE, A. & NAVARRO, X. ; Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair . *J Neurotrauma* , **21**: 95-108 , 2004.
62. VAN MEETEREN, N.L.; BRAKKEE, J.H.; HELDERS, P.J.; GISPEN, W.H.; The effect of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J Peripher Nerv Syst* , **3**: 277-82,1998.
63. VASQUEZ, L.H., VAZQUEZ, R.H., MOXON, K.A., KUOP, K.H., VIAU,V., ZHAN, Y., CHAPIN, J.K. Distinct tempopral activity patterns in the rat M1 and red nucleus during skilled versus unskilled limb movement. *Behav Brain Res* , **150** : 93-107, 2004.
64. VOGELIN, E.; BAKER, J.M.; GATES, J.; DIXIT, V.; COSNTANTINESCU, M.A.; JONES , N.F. Effects of local continous release of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp Neurol* **199**: 348-53,2006.

65. WARD, N.S.; BROWN, M.M.; THOMPSON, A.J.; FRACKOWIAK, R.S. Neural correlates of outcome after stroke: a cross-sectional FMRI study . *Brain* **126**: 1430-48,2003.
66. WILKINS, R. H. ; Lesões de Nervos Periféricos . In *Sabiston Text Book of Surgery* , **2**(10): 1372-1373 , 1997.
67. ZHANG, J.Y.; LUO, X.G.; XIAN, C.J.; LIU, Z.H.; ZHOU, X.F. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci* **12**: 4171-80,2000.

