

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

**EFEITOS DA VIBRAÇÃO DE CORPO INTEIRO SOBRE A  
MORFOFUNCIONALIDADE DO NERVO ISQUIÁTICO EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DE LESÃO POR ESMAGAMENTO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Charlanne de Oliveira Marques**

Porto Alegre

2017

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

**EFEITOS DA VIBRAÇÃO DE CORPO INTEIRO SOBRE A  
MORFOFUNCIONALIDADE DO NERVO ISQUIÁTICO EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DE LESÃO POR ESMAGAMENTO**

**Charlanne de Oliveira Marques**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Faccioni-Heuser**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Taís Malysz**

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.

Porto Alegre

2017

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte única de nossa existência.

À Profa. Maria Cristina, inicialmente por ter me aceitado como sua orientanda, por seus conselhos e acolhimento durante a realização do mestrado. Por seus ensinamentos sobre microscopia, paciência e orientação na realização deste estudo.

À Profa. Taís Malysz por sua ajuda, companheirismo e incansáveis ensinamentos.

À Profa. Wania Partata por seus conhecimentos compartilhados e colaboração na realização dos experimentos.

À Profa. Anelise Sonza, pela disponibilidade e conhecimentos compartilhados acerca da plataforma vibratória.

Ao Leandro Viçosa pelos valiosos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos e colegas Mirelle Casagrande, Giana Montagner, Mariana Vitti, Brenda Tubelo e Cristiano Donizetti pelos esforços e auxílios durante a execução prática deste estudo.

Aos colegas do laboratório, pela amizade, auxílio, compreensão e ensinamentos compartilhados.

Aos graduandos Izabela Espíndula e Kwame Karix pela disposição e ajuda durante a execução dos experimentos.

A Antônio Generoso pela fiel ajuda para a execução deste estudo.

Aos professores do PPG Neurociências pelos ensinamentos e orientação, aos funcionários do ICBS – UFGRS, em especial, aos bioteristas e veterinários pelos cuidados e orientações acerca do melhor manuseio dos animais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro, necessário para execução deste estudo.

A toda minha família, especialmente, meus pais pelo apoio em todos os momentos e decisões da minha vida.

Aos amigos e irmãos pela motivação em cada etapa desta jornada.

Muito obrigada

Se você quer encontrar os segredos do Universo  
pense em termos de energia, frequência e vibração.

Nikola Tesla

## RESUMO

Os efeitos de diferentes formas de modalidades terapêuticas sobre a regeneração nervosa periférica e a recuperação funcional têm sido alvo de investigação em estudos experimentais. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da vibração de corpo inteiro sobre a morfofuncionalidade do nervo isquiático em um modelo de lesão por esmagamento. Ratos Wistar machos foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos: controle (C; n=10), *sham* (SH; n=10), lesionados e não treinados (NT; n=11), lesionados e treinados com vibração de corpo inteiro iniciada 3 dias após a lesão (V3; n=11) e lesionados e treinados com vibração de corpo inteiro iniciada 10 dias após a lesão (V10; n=11). A lesão foi realizada pelo esmagamento do nervo isquiático direito. O treinamento teve início 3 ou 10 dias após a lesão (conforme o grupo) e foi realizado em uma plataforma vibratória (TBS 100A Total Image Fitness Inc; CA) adaptada para o uso em animais. Os parâmetros utilizados foram: cinco séries de 3 minutos nas frequências de 15 Hz e 30Hz e amplitude de 2 mm, cinco dias por semana, durante cinco semanas. Para avaliar a recuperação funcional foram utilizados o cálculo do Índice Funcional do Isquiático (IFI), Teste da Escada Horizontal (EH) e Teste da Barra Estreita (BE), os quais foram realizados duas vezes por semana ao longo do treinamento. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia por perfusão transcardíaca e foi coletada a porção do nervo isquiático distal ao local da lesão. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em acetona e incluídas em resina (Durcupan; ACM-Fluka). Cortes transversais semifinos foram realizados utilizando o Ultramicrótomo (Leica), corados com azul de toluidina e utilizados para análises histológicas e morfométricas. Para análise das imagens foi utilizado o programa *Image Pro Plus* 6.0. As análises estatísticas dos parâmetros funcionais e morfométricos foram realizadas conforme o modelo de Equações de Estimativas Generalizadas e ANOVA *oneway*, respectivamente, onde a significância foi considerada para  $P < 0,05$ . Ao final do treinamento, os valores do IFI foram menores nos grupos NT, V3 e V10 que os dos grupos C e SH ( $P < 0,05$ ). No teste EH, os grupos NT, V3 e V10 apresentaram maior número de erros que os grupos C e SH ( $P < 0,05$ ). No teste BE, apenas o grupo V10 apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação aos grupos C e SH, enquanto que os grupos NT e V3 apresentaram recuperação funcional completa. No decorrer do experimento o grupo lesionado que iniciou o treinamento 10 dias após a lesão teve maior déficit funcional que o grupo lesionado não treinado e treinado a partir de 3 dias após a lesão 13 dias (IFI), 16 dias (IFI e EH), 28 e 35 dias (BE) após a lesão. Na comparação entre os valores dos grupos lesionados treinados (V3 e V10), o grupo V10 mostrou maior déficit funcional no 13º dia após a lesão (IFI;  $P < 0,05$ ). Nas análises histológicas e morfométricas, os grupos lesionados NT, V3 e V10 apresentaram regeneração nervosa incompleta, com menor porcentagem de fibras nervosas mielinizadas, menor área de secção transversa das fibras nervosas mielinizadas, menor espessura da bainha de mielina e maior grau de mielinização ( $P < 0,05$ ). Não existiram diferenças entre os grupos lesionados para os parâmetros morfométricos. Em conclusão, nos ratos submetidos à lesão do nervo isquiático, o treinamento físico por vibração não alterou os parâmetros histomorfométricos deste nervo, porém, quando iniciado 10 dias após a lesão nervosa, promoveu prejuízos na recuperação funcional.

## ABSTRACT

The effects of therapeutic modalities on peripheral nerve regeneration and functional recovery have been investigated in animal models of nerve injury. In this study, we analyze the effects of whole body vibration on the morphological and functional regeneration of the sciatic nerve in a crush injury model. Male Wistar rats were randomly assigned to five groups: control (C; n = 10), sham (SH; n = 10), lesioned and no trained (NT; n = 11), injured and trained with whole body vibration initiated 3 days after injury (V3; n = 11) and injured and trained with whole body vibration started 10 days after injury (V10; n = 11). The lesion was performed by crushing the right sciatic nerve. The training started 3 or 10 days after injury (according to the group) and was performed on a vibratory platform (TBS 100A Total Image Fitness Inc; CA) adapted for use in animals. The training protocol was: five trials of 3 minutes in the frequencies of 15 Hz and 30 Hz and amplitude of 2 mm, five days a week, for five weeks. We analyze the functional recovery through the Sciatic Functional Index (SFI), the Horizontal Ladder Rung Walking Test (HLRWT) and the Narrow Beam Test (NBT). These tests, were performed twice a week along the training. At the end of the protocol, the animals were anesthetized and euthanized by transcardiac perfusion and the segment of the sciatic nerve distal to the lesion site was collected. The samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde and post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in acetone and included in resin (Durcupan; ACM-Fluka). Semithin transversal slices were performed through the Ultramicrotome (Leica), stained with toluidine blue and used for histological and morphometric analysis. Image Pro Plus 6.0 was used to analyze the images. The statistical analysis of the functional and morphometric parameters involved were performed according to the Generalized Estimation Equations model and one way ANOVA, respectively, where the significance was considered for  $P < 0.05$ . At the end of the training, the SFI values were lower in the NT, V3 and V10 groups than in the C and SH groups ( $P < 0.05$ ). In the HLRWT test, the NT, V3 and V10 groups showed a greater number of slips than the C and SH groups ( $P < 0.05$ ). In the NBT test, only the V10 group presented a significant difference ( $P < 0.05$ ) in relation to the C and SH groups, while the NT and V3 groups presented complete functional recovery. In the course of the experiment V10 group had a greater functional deficit than NT group on 13 days (SFI), 16 days (SFI and HLRWT) and 28 days after injury (NBT). In the comparison between the values of the trained injured groups (V3 and V10), the V10 group showed a greater functional deficit 13 days (SFI) and 17 days (NBT) after injury and at the end of the experiment ( $P < 0.05$ ). In the histological and morphometric analyzes, the NT, V3 and V10 have incomplete nerve regeneration, with a lower percentage of myelinated nerve fibers, a smaller cross-sectional area of the myelinated nerve fibers, a smaller myelin sheath thickness and a higher myelinization degree ( $P < 0.05$ ). There were no differences between the injured groups for the morphometric parameters. In conclusion, in rats submitted to sciatic nerve crush, whole body vibration training did not alter the histomorphometric parameters of this nerve, however, its impaired functional recovery in the group in which the training was started on the 10 days after injury.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagem da plataforma vibratória adaptada para o treinamento dos animais.....	32
Figura 2: Linha do tempo representando o protocolo experimental.....	34
Figura 3: Aparato utilizado para o Teste da Escada Horizontal.....	36
Figura 4: Aparato utilizado para Teste da Barra Estreita.....	37
Figura 5: Gráfico apresentando os dados do índice funcional do isquiático, (IFI) avaliado após a lesão por esmagamento do nervo isquiático para os grupos do estudo.....	41
Figura 6: Gráfico representando o número médio de erros durante o Teste da Escada Horizontal em diferentes dias após a lesão por esmagamento do nervo isquiático para os grupos do estudo.....	42
Figura 7: Gráfico representando o número médio de erros durante o Teste da Barra Estreita conforme os dias após a lesão por esmagamento do nervo isquiático para os grupos do estudo.....	44
Figura 8: Imagens digitalizadas de cortes semifinos transversais da porção distal do nervo isquiático corados com azul de toluidina.....	45
Figura 9: Gráfico apresentando o parâmetro morfométrico de porcentagem de área ocupada por fibras mielinizadas (A) e porcentagem de área ocupada por endoneuro, vasos sanguíneos e fibras amielínicas (B) do nervo isquiático para os grupos do estudo.....	47
Figura 10: Gráficos apresentando os parâmetros morfométricos da área média das fibras mielinizadas (A), área média dos axônios das fibras mielinizadas (B), diâmetro médio das fibras mielinizadas (C), diâmetro médio dos axônios das fibras mielinizadas (D), espessura média da bainha de mielina (E) e grau de mielinização médio (F) do nervo isquiático para os grupos do estudo.....	48

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	09
1.1Estrutura do nervo periférico.....	09
1.2Lesão nervosa periférica.....	12
1.2.1Classificação das lesões nervosas periféricas.....	12
1.2.2Quadro clínico.....	13
1.2.3O nervo isquiático de ratos e modelos experimentais em lesão nervosa periférica.....	14
1.3Regeneração nervosa periférica.....	15
1.3.1A sobrevivência neuronal.....	15
1.3.2A formação do ambiente para o crescimento axonal: a degeneração axonal.....	16
1.3 O crescimento axonal.....	17
1.3.4A reinervação.....	19
1.4O exercício físico na regeneração nervosa periférica.....	19
1.5Vibração.....	22
1.5.1Bases físicas da vibração.....	22
1.5.2Bases neurofisiológicas da vibração como exercício físico.....	23
2.JUSTIFICATIVA.....	27
3.OBJETIVOS.....	29
3.1Objetivo geral.....	29
3.2Objetivos específicos.....	29
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1Modelo animal e grupos experimentais.....	30
4.2Procedimento cirúrgico.....	31
4.3Treinamento físico com vibração.....	32
4.4Testes comportamentais.....	34
4.4.1Índice Funcional do Nervo Isquiático (IFI).....	35
4.4.2Teste da Escada Horizontal (EH).....	36
4.4.3Teste Caminhada da Barra Estreita (BE).....	37
4.5Análises histológica e morfométrica do nervo isquiático.....	38
4.6Análises estatísticas.....	39
5.RESULTADOS.....	40
5.1Testes comportamentais.....	40
5.1.1Índice Funcional do Nervo Isquiático – IFI.....	40
5.1.2Teste da Escada Horizontal (EH).....	42
5.1.3Teste da Barra Estreita (BE).....	43
5.2Análises histológica e morfométrica do nervo isquiático.....	45
5.2.1Análise morfométrica.....	46
6.DISSCUSSÃO.....	49
7.CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61



## 1. INTRODUÇÃO

As lesões traumáticas do sistema nervoso periférico podem resultar em déficits neurológicos significativos, gerando prejuízos na qualidade de vida dos pacientes. Eles geralmente resultam de acidentes automobilísticos, lacerações por objetos cortantes, alongamentos excessivos ou esmagamentos durante traumas, fraturas e ferimentos de bala (ESER et al., 2009). As disfunções típicas observadas em lesões nervosas periféricas incluem alterações das funções sensoriais, motoras e autonômicas, que podem resultar em paralisia completa, desenvolvimento de dor neuropática e uma recuperação sensorial e/ou motora não satisfatória (GRINSELL; KEATING, 2014).

Diferentes modalidades de exercício físico como treinamento em esteira ergométrica (CUNHA et al., 2011), natação (TEODORI et al., 2011), exercício de resistência (ILHA et al., 2007), equilíbrio e coordenação (BONETTI et al., 2017) têm sido aplicadas no tratamento das lesões nervosas periféricas traumáticas e de suas alterações funcionais (UDINA et al., 2011). Atualmente, embora seus efeitos não sejam totalmente esclarecidos, a vibração tem sido uma modalidade de treinamento físico que vem ganhado destaque na prática clínica (RITTWEGGER, 2009). Desse modo, considerando-se a importância que se tem dado a esta terapia, este estudo tem como objetivo estudar os efeitos da vibração de corpo inteiro sobre a morfofuncionalidade do nervo isquiático em um modelo experimental de lesão nervosa periférica.

Este capítulo abordará a estrutura do nervo periférico, a lesão nervosa periférica, a regeneração nervosa periférica, o exercício físico na regeneração nervosa periférica e a vibração.

### 1.1 Estrutura do nervo periférico

A unidade microscópica funcional do nervo periférico é a fibra nervosa a qual é composta por axônios associados a células de Schwann e pode ser classificada em fibra mielinizada ou fibra amielinizada (FLORES; LAVERNIA; OWERNS, 2000; KERNS, 2008). As fibras mielinizadas possuem células de Schwann dispostas em série, as quais envolvem o axônio com múltiplas camadas concêntricas de membrana plasmática, formando a bainha de mielina. A estreita região do axônio entre os segmentos mielinizados é chamada de nodo de Ranvier. Por outro lado, as fibras não mielinizadas são axônios que estão intimamente associados ou envelopados por processos das células

de Schwann, porém não são compactados por camadas de membrana plasmática destas células, como nas fibras mielinizadas. Neste caso, essas células formam uma bainha contínua para as fibras não mielinizadas, denominada de fibras de Remak (KERNS, 2008).

Internamente, cada fibra nervosa é envolvida por finas fibras de colágeno que formam o endoneuro, um tecido conjuntivo que apresenta certa resistência à tração, porém oferece pouco suporte mecânico. O agrupamento de fibras envoltas pelo endoneuro constitui o fascículo, o qual é envolvido por multicamadas areolares de tecido conjuntivo fino e denso, o perineuro. Ele é o principal tecido de resistência e elasticidade do nervo e, também, constitui uma barreira de difusão, resistindo e mantendo a pressão intrafascicular (SUNDERLAND, 1990; FLORES; LAVERNIA; OWERNS, 2000).

Entre os fascículos existe um tecido conjuntivo interfascicular o epineuro interno. Ele é envolvido por uma bainha externa ou epineuro extrafascicular que serve como um envelope para formação do tronco nervoso. A principal função do epineuro é proteger os fascículos de forças de compressão, oferecer consistência e manter a forma do tronco nervoso, além de facilitar o movimento individual de cada fascículo. Fibroses do epineuro, por exemplo, em lesões nervosas, inibem o deslizamento longitudinal do nervo (SUNDERLAND, 1990).

Todas essas estruturas que constituem o nervo são supridas por um arranjo longitudinal de um sistema de vasos que se anastomosam na superfície e internamente ao nervo. Esse sistema é essencial na sobrevivência e integridade funcional dos axônios. Ele é formado por uma sucessão de artérias que entram em um nervo, nutrindo-o ao longo do seu curso. Vasos maiores estão localizados na superfície e no epineuro e capilares estão localizados dentro de cada fascículo (SUNDERLAND, 1990; FLORES; LAVERNIA; OWERNS, 2000).

Funcionalmente, as fibras do nervo periférico podem ser sensitivas, somáticas, motoras somáticas e autônomas. Fibras sensitivas são extensões de neurônios sensitivos cujos corpos celulares se localizam em gânglios sensoriais. Potenciais de ação desencadeados por estímulos sensitivos propagam-se ao longo da fibra, passando pelos gânglios até atingirem o sistema nervoso central (PURVES et al., 2010).

Conforme o diâmetro e velocidade de condução de seus axônios, as fibras sensitivas podem ser classificadas em diferentes tipos. Fibras A $\alpha$  são fibras mielinizadas que tem os maiores diâmetro (13-20 $\mu$ m) e velocidade (80-120 m/s), exemplos deste tipo

de fibra são as aferências Ia e Ib. Aferências Ia são sensíveis a alterações dinâmicas (velocidade e direção do comprimento muscular e são encontradas nos fusos musculares, um agrupamento de fibras musculares (intrafusais) em forma de fuso, distribuídas entre as fibras (extrafusais) do músculo esquelético. Aferências Ib formam os órgãos neurotendíneos (órgãos tendinosos de Golgi), mecanorreceptores presentes nos tendões das fibras musculares extrafusais, sensíveis a tensão muscular (TOPP; BOYD, 2012).

Fibras A $\beta$  são mielinizadas e possuem diâmetro (6-12 $\mu$ m) e velocidade (35-75m/s) ligeiramente menores e também incluem aferências presentes nos fusos musculares: as aferências II, que fornecem informações acerca da posição estática dos membros (TOPP; BOYD, 2012). Entretanto, a grande maioria das fibras A $\beta$  são as que transmitem parte da informação relacionada ao tato, como forma e textura (células de Merkel, da epiderme), detecção de movimentos sobre a pele (células de Meissner das papilas dérmicas), detecção de estímulos vibratórios (aferentes de Pacini, da derme) e detectores de forma e direção do movimento (receptores de Ruffini, da derme) (para revisão ver PURVES et al., 2010).

Fibras A $\delta$  são mielinizadas e possuem diâmetro de 1-5  $\mu$ m e velocidade de 5-20 m/s. Fibras C são amielinizadas e possuem diâmetro de 0,2-1,5  $\mu$ m e velocidade de 0,5-2 m/s. Juntas, estas fibras transmitem informações de dor e temperatura (TOPP; BOYD, 2012).

As fibras motoras ou eferentes somáticas são fibras mielinizadas cujos axônios são extensões de neurônios motores com corpos celulares localizados na região ventral da medula espinal (KERNS, 2008; TOPP; BOYD, 2012), onde fazem conexões com interneurônios ou neurônios motores superiores do tronco encefálico ou do córtex cerebral para o controle motor (PURVES et al., 2010). Cada neurônio motor inerva fibras musculares de um único músculo. Existem dois tipos de neurônios motores somáticos: neurônio motor gama e neurônio motor alfa. Neurônios motores gama inervam as extremidades dos fusos musculares (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008), regulando as entradas sensoriais das aferências Ia. Neurônios motores alfa inervam as fibras musculares extrafusais. Um único neurônio motor alfa, seu axônio e as fibras musculares que ele inerva constituem a unidade motora (PURVES et al., 2010).

Tanto as unidades motoras quanto seus neurônios variam de tamanhos. Neurônios pequenos inervam um menor número de fibras musculares e formam

unidades motoras que geram pequena força de contração. Neurônios grandes inervam um maior número de fibras e suas unidades motoras são maiores e mais potentes (PURVES et al., 2010).

As unidades motoras também diferem quando ao tipo de fibras musculares que inerva. Em geral, unidades motoras pequenas inervam fibras musculares também pequenas, que se contraem lentamente, gerando menos força, mas por apresentarem resistência à fadiga, constituem unidades motoras lentas (L). Neurônios maiores inervam fibras musculares maiores, capazes de gerar mais força. Entretanto, por serem facilmente fatigáveis, constituem as unidades motoras rápidas fatigáveis (RF). Uma terceira classe de unidade motora tem propriedades intermediárias entre as outras duas. Ela constitui as unidades motoras rápidas resistentes à fadiga (RRF) que são de tamanho intermediário, não são tão rápidas como as unidades RF e geram o dobro da força das unidades L (PURVES et al., 2010).

Fibras eferentes autônomas são amielinizadas e constituem-se de axônios cujos corpos celulares se encontram em gânglios simpáticos, onde através do nervo, seguem para suprir vasos sanguíneos e glândulas exócrinas da área corporal inervada (ZOCHODNE, 2008).

## 1.2 Lesão nervosa periférica

### 1.2.1 Classificação das lesões nervosas periféricas

As lesões nervosas periféricas foram classificadas inicialmente por Seddon (1943) em três categorias: neuropraxia, axonotmese e neurotmeze, conforme a presença de desmielinização e a extensão da lesão aos axônios e tecidos conjuntivos do nervo. A neuropraxia é uma lesão caracterizada por uma desmielinização local, causada por uma suave compressão ou tração nervosa. Devida a desmielinização local há déficit motor e sensorial, porém sem interrupção ou degeneração axonal. Os déficits funcionais persistem até o início da remielinização, onde, conforme os diferentes graus de remielinização axonal, a recuperação pode se estender por horas a poucos meses, sem intervenção (CAMPBELL, 2008).

A axonotmese, em adição à desmielinização local, envolve uma lesão direta ao axônio, enquanto se mantém parcialmente a integridade dos tecidos conjuntivos do nervo. A recuperação dependerá do grau da desorganização tecidual interna e da

distância ao órgão inervado, podendo ser prolongada e incompleta. A neurotmele é o rompimento total dos axônios e das camadas de tecido conjuntivo, resultando em completa descontinuidade do nervo. Sua recuperação não ocorre espontaneamente, necessitando-se de intervenção cirúrgica (CAMPBELL, 2008; MENORCA, FUSSELL; ELFAR, 2013).

Posteriormente, Sunderland (1951) expandiu essas classificações em 5 graus, especificando-as conforme a extensão da lesão no tecido conjuntivo. O grau 1 e o grau 5 correspondem as lesões de neuropraxia e neurotmele, respectivamente. Os graus 2 a 4 são subdivisões da axonotmele, conforme maior comprometimento do tecido conjuntivo. No grau 2, a lesão axonal é presente, porém, sem envolvimento do tecido conjuntivo. No grau 3, existe lesão do endoneuro e no grau 4, lesão no perineuro. Outros autores têm descritos outros graus de lesão, representadas por uma associação de várias lesões com perdas axonais e bloqueio da condução nervosa que ocorrem em algumas fibras (ROBINSON, 2000). As classificações das lesões nervosas periféricas são importantes para a compreensão do quadro clínico e no processo de regeneração (SUNDERLAND, 1990).

### 1.2.2 Quadro clínico

O prognóstico clínico após uma lesão nervosa periférica é dependente de fatores como idade, mecanismo de lesão e gravidade das lesões teciduais e vasculares associadas. Geralmente, estão presentes alterações: sensoriais, motoras e autonômicas. Entre os sintomas sensoriais encontram-se: parestesia, disestesia, hiperalgesia e dor neuropática (GAGLIARDO et al., 2015).

As alterações motoras e musculares incluem: hipostenia, hipotrofia ou atrofia muscular, fasciculações, ausências ou redução dos reflexos osteotendinosos e redução da mobilidade articular. Essas alterações ocorrem devido a denervação muscular, que leva a redução no número de unidades motoras funcionais e dos potenciais ação no músculo, provocados pela lesão axonal (GAGLIARDO et al., 2015).

Entre os músculos mais afetados pela lesão nervosa periférica estão os músculos predominantemente de contração lenta, pois são mais requisitados durante a execução das atividades de vida diária. Entre os músculos de contração rápida, os mais afetados são os que são mais ativos e, portanto, mais atingidos pela denervação. Além disso, a denervação faz com que o fenótipo muscular seja alterado. Fibras musculares lentas se

transformam em fibras musculares rápidas e *vice versa*. A reinervação e o recrutamento destes músculos durante atividades como exercício podem auxiliar na recuperação do fenótipo muscular (UDINA et al., 2011).

### 1.2.3 O nervo isquiático do rato e modelos experimentais de lesão nervosa periférica

Os estudos pré-clínicos e experimentais das lesões nervosas periféricas são realizados em modelos animais (KORB et al., 2009; ARBAT-PLANA et al., 2015) e *in vitro* (GEUNA et al., 2016; YANG et al., 2017). A maioria dos protocolos experimentais costuma utilizar lesão nervosa periférica do nervo isquiático de ratos. A utilização deste nervo justifica-se pela facilidade de seu acesso cirúrgico (GEUNA, 2015) e por este ter estrutura e distribuição anatômica similar à de humanos (TOS et al., 2009). Além disso, sua regeneração após a lesão é similar à de primatas, permitindo assim padronização na prática científica e análises de parâmetros de recuperação sensorial, motora e estrutural, ao longo do tempo (VAREJÃO et al., 2001).

O nervo isquiático é um nervo misto oriundo do plexo lombo-sacral. No rato ele tem origem predominantemente em nervos espinais oriundos do quarto e quinto segmentos lombares da medula espinal (SAVASTANO et al., 2014). Ele é composto pelo nervo tibial e o nervo fibular comum, que geralmente se mantêm unidos por tecido conjuntivo até a fossa poplíteia. O nervo fibular comum inerva a porção curta do bíceps femoral, envia ramos para a articulação do joelho e segue para a região anterior e lateral da perna onde supre músculos (dorsiflexores e extensores dos dedos) e pele. O nervo tibial segue obliquamente através da fossa poplíteia para a região medial da perna, entre as duas fixações próximas do músculo gastrocnêmio, onde envia ramos que supre músculos da região posterior e medial da perna e do pé (plantiflexores e flexores dos dedos). O sural, ramo do nervo fibular comum, também contribui para inervação, enviando ramos cutâneos para o terço posterior distal da coxa e região lateral da perna, além de se unir a ramos do nervo tibial, contribuindo para um pequeno número de fibras motoras destinadas à inervação dos músculos abdutor e flexor do quinto dedo (para revisão ver GREENE, 1955).

Os modelos de lesão nervosa periférica incluem técnicas de constrição crônica (MACKINNON et al., 1984; BENNETT; XIE, 1988), esmagamento (BRIDGE et al., 1994; VAREJÃO et al., 2004) e transecção (TOS et al., 2009; LIAO et al., 2017). O modelo de esmagamento, utilizado neste estudo, é tipicamente produzido pela aplicação

de uma lesão no nervo com uma pinça lisa com auxílio de uma pinça hemostática. Bridge et al. (1994) demonstraram que esse procedimento produz uma lesão do tipo Sunderland tipo 2 ou tipo 3, com gradual e incompleta recuperação sem intervenção.

### 1.3 Regeneração nervosa periférica

Os processos de regeneração do nervo envolvem uma série de fatores relacionados ao neurônio, ao ambiente de crescimento axonal e ao seu órgão alvo. Primeiro, o neurônio deve sobreviver à lesão e induzir repostas metabólicas eficazes para iniciar a regeneração. Em segundo lugar, o ambiente de crescimento da porção distal da lesão deve fornecer suporte suficiente para regeneração dos axônios. Em terceiro lugar, o axônio regenerado com sucesso deve reinervar corretamente seu alvo e este deve reter a capacidade de aceitar a reinervação e recuperar-se da atrofia, resultante do período de denervação (FU; GORDON, 1997).

Esses processos envolvem mecanismos extrínsecos e intrínsecos do local da lesão e segue uma série de eventos morfológicos e fisiológicos progressivos das regiões proximal à distal da lesão (STA et al., 2014).

#### 1.3.1 A sobrevivência neuronal

Após uma lesão, a sobrevivência do neurônio depende de alguns fatores como, por exemplo: o tipo de neurônio lesionado, o grau da lesão e a distância do local da lesão ao corpo celular (FU; GORDON, 1997). Alguns neurônios sensoriais, por exemplo, apresentam maior dificuldade de regeneração e dificilmente recuperam sua arborização sináptica (ARBAT-PLANA et al., 2015). Além disso, quanto mais distante for o local da lesão em relação ao corpo celular, mais susceptível será o neurônio a morte celular. Por outro lado, para sua sobrevivência, os neurônios sofrem uma série de alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares características, onde adquirem funções direcionadas ao crescimento celular como, por exemplo, aumento da síntese de proteínas do citoesqueleto celular, neurotransmissores e fatores de crescimento (FU; GORDON, 1997).

Para isso, inicialmente, no corpo celular ocorre a reação neuronal ou cromatólise. Ela é caracterizada pela dispersão da substância de Nissl, deslocamento do núcleo celular para periferia, edema e perda ou retração dos terminais sinápticos. A

extensão desta reação é variável (LIU et al., 2011) e dependente das reações metabólicas local, da síntese de proteínas e organelas (HE; JIN, 2016) e de fatores de crescimento produzidos por células gliais e pelos próprios neurônios (FU; GORDON, 1997).

### 1.3.2 A formação do ambiente para o crescimento axonal: a degeneração axonal

Enquanto a reação neuronal representa alterações metabólicas necessárias para regeneração e crescimento axonal, os axônios distais ao local da lesão ao serem desconectados do corpo celular de seus neurônios, degeneram através de um processo conhecido como degeneração Walleriana, criando um microambiente favorável à regeneração axonal dos neurônios sobreviventes (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007).

Durante esse processo, os axônios e as bainhas de mielina são degenerados. A degeneração também afeta retrogradamente uma pequena porção do segmento proximal do nervo, que se segue até o primeiro nodo de Ranvier (SULAIMEN; GORDON, 2013). Ela está associada ao influxo de cálcio e a ativação de proteases associadas a este íon que promovem a desintegração granular do citoesqueleto axonal (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011).

Os produtos gerados pela degeneração são eliminados por uma ação cooperada entre células de Schwann e células do sistema imune, como os macrófagos. Os primeiros sinais de degeneração são observados dentro de 24 horas após a lesão e podem durar aproximadamente de 1 a 2 semanas (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007). Isso porque a degeneração não começa imediatamente após a lesão e axônios remanescentes ainda podem transmitir potenciais de ação quando estimulados. O tempo entre a lesão e o início da degeneração axonal é de 24 a 48 horas em ratos jovens, sendo que em primatas, incluindo o homem, pode levar vários dias (GAUDET, POPOVICH; RAMER, 2011). Ela se estende por 3 a 5 dias em fibras motoras e 6 a 10 dias em fibras sensoriais (GAGLIARDO et al., 2015).

A eliminação da bainha de mielina permite a remoção de fatores inibitórios da regeneração que são associados à mielina, como glicoproteínas associadas à mielina. Através da ativação de receptores tirosina quinase erbB2, as células de Schwann iniciam rapidamente (5h a 24 h após) o desprendimento da bainha de mielina após a axotomia (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007).



Entretanto, a principal via de fagocitose da mielina e dos restos axonais é através do recrutamento de macrófagos hematogênicos (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007). Durante a primeira semana de lesão ocorre um aumento na permeabilidade vascular (PODHAJSKY; MYERS, 1993) onde aproximadamente 2 a 3 dias após a lesão, macrófagos são atraídos por citocinas como proteína quimiotática de monócitos 1, fator inibidor da leucemia (LIF) e interleucina (IL) IL-1, secretadas pelas células de Schwann (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007).

Neste período, os macrófagos secretam principalmente citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como, por exemplo: interleucina (IL) -  $1\beta$ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e proteína quimiotática de monócitos tipo 1 (MCP-1) que ativam uma série de cascatas enzimáticas que promovem o colapso da mielina e mantêm o nervo inflamado nos primeiros dias após a lesão. Aproximadamente, 10 dias após a lesão, essas células assumem um fenótipo de regeneração e reparo tecidual, produzindo numerosos fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 (IFG-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-a) e secreção, predominantemente, de citocinas e quimiocinas anti-inflamatórias (MIETO; MOSTACADA; MARTINEZ, 2015; WYNN; VANELLA, 2015).

Devida a perda do contato axonal e pela estimulação de proteínas liberadas pelos axônios em degeneração e das citocinas secretadas pelos macrófagos, as células de Schwann tornam-se reativas e começam a se proliferar. A mais alta taxa de multiplicação das células de Schwann ocorre no período de 3 dias após a lesão e então continua a decrescer ao longo de 2 a 3 semanas para então atingir um aumento de três vezes em número (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007).

### 1.3.3 O crescimento axonal

Próximo ao local da lesão, a partir do primeiro nodo de Ranvier, cones de crescimento emergem de vários axônios progenitores. Uma média de cinco brotos axonais, por axônio, é formada e direcionada ao segmento distal. A partir destes brotos as primeiras fibras nervosas emergem e sofrem extensivas ramificações, onde um único axônio dá origem a 50 a 100 ramos. Posteriormente, muito destes ramos assumem uma forma espiralada e desaparecem, enquanto outros continuam seu processo de alongamento e crescimento, a uma velocidade variável (FU; GORDON, 1997). No rato,

por exemplo, a taxa de alongamento do axônio recém-formado é inicialmente lenta, mas acelera em uma taxa constante de 3,2 mm/dia a partir do terceiro dia após a lesão (SJOBERG; KANJE, 1990). Nestes processos, as proteínas essenciais para o citoesqueleto axonal são transportadas principalmente do corpo neuronal, para os axônios-filhos ou recém-formados (FU; GORDON, 1997).

Os axônios se alongam conforme são direcionados por substâncias quimioatrativas ou quimiorrepulsivas como fatores tróficos e moléculas neurotróficas. Esses fatores agem nos neurônios, influenciando sua sobrevivência e regulam a proliferação e formação da mielina e podem ser sintetizados e secretados por células gliais, neurônios, pelo órgão alvo e outras fontes. As células de Schwann denervada, por exemplo, super-expressam fibronectina, laminina e alguns proteoglicanos que aumentam a expressão de fatores neurotróficos como fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e IGF-1 (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012).

Cada fator neurotrófico tem diferentes funções. A neurotrofina -3 (NT-3), por exemplo, é essencial para sobrevivência de neurônios sensoriais e proprioceptivos e juntamente com o BDNF regula a plasticidade sináptica, formação e densidade de inervação das sinapses dos motoneurônios (ARBAT-PLANA et al., 2015).

Na ausência de uma estrutura que os possa guiar adequadamente, os axônios adquirem caminhos inespecíficos, sem orientação e formam neuromas, compostos pela associação entre axônios imaturos e tecido conjuntivo (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007). Por outro lado, quando atingem a porção distal do nervo, eles crescem e alongam-se dentro de tubos endoneurais, em associação com células endoteliais (WYNN; VANELLA, 2015), células de Schwann e uma lâmina basal, constituindo unidades de regeneração (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007).

Com o contato entre o axolema dos axônios em regeneração e as células de Schwann, a remielinização é iniciada. A interação induz a síntese de galactocerebrosídeos e a expressão de proteínas associadas à mielina nas células de Schwann. Embora as células de Schwann sintetizem a bainha de mielina, é o crescimento do axônio que determina a extensão da mielinização, com as células de Schwann formando camadas de mielina que aumentam em número em proporção com o tamanho do axônio (FU; GORDON, 1997).

#### 1.3.4 A reinervação

Ao avançarem distalmente, os axônios podem atingir seus alvos, crescendo dentro do músculo, no local previamente ocupado pelos axônios que o inervavam (SON; TRACHTENBERG; THOMPSON, 1996). Eles crescem em diâmetro, mas não se aproximam do tamanho normal, ao menos que estabeleçam conexões funcionais (FU; GORDON, 1997).

Inicialmente, a reinervação formada é polissináptica e à medida que o contato sináptico é restabelecido, o nervo estimula o músculo a diminuir a síntese de receptores extrajuncionais, diminuindo a liberação de fatores neurotrófico (GORIO et al., 1983). Se a conexão for estabelecida, todos, menos um axônio filho, são retirados (FU; GORDON, 1997) e a membrana pós-sináptica então, estabelece o mecanismo de eliminação sináptica, inibindo o crescimento dos neuritos axonais e transformando-o em terminal nervoso ou botão sináptico. A partir daí, então, estabelece-se, a monoinervação muscular (GORIO et al., 1983).

Dentro de 15 dias após a lesão, 25% das fibras musculares já estão poliinervadas, atingindo seu máximo de inervação aos 25 dias, onde a atividade mecânica do músculo está parcialmente recuperada. A monoinervação e o restabelecimento das junções neuromusculares ocorrem no período de 60 a 90 dias após a lesão por esmagamento do nervo isquiático, no rato (GORIO et al., 1983).

#### 1.4 O exercício físico na regeneração nervosa periférica

Com o objetivo de manter as propriedades musculares durante a denervação e promover a recuperação funcional, o exercício físico tem sido utilizado como forma de reabilitação após lesões nervosas periféricas (GALEA, 2012).

Os efeitos do exercício sobre a regeneração nervosa periférica e recuperação funcional não estão totalmente claros, mas acredita-se que a atividade física repetida reforça a circuitaria do sistema nervoso e facilita a recuperação funcional por promover plasticidade estrutural e crescimento axonal. Isso tem sido associado a mudanças na expressão de neurotrofinas, assim como de genes associados ao crescimento neuronal pelo exercício físico (ARBAT-PLANA et al., 2015).

O aumento de impulsos sensoriais e motores pelo exercício têm influenciado positivamente a função neuromuscular (UDINA; PUIGDEMASA; NAVARRO, 2011).

A atividade muscular induzida pelo exercício pode resultar numa liberação autócrina de fatores tróficos, evitando assim, o efeito do desuso devida a lesão, produzindo melhor preservação e recuperação das propriedades musculares funcionais (UDINA et al., 2011).

Entre os fatores neurotróficos relacionados aos efeitos do exercício está o BDNF. Aumento da expressão desta neurotrofina em motoneurônios é encontrado na prática de exercícios aeróbicos e quando os animais perdem a sensibilidade a responderem a BDNF ou a seus receptores perdem, simultaneamente, os efeitos que exercício poderia ter (ENGLISH; WILHELM; WARD, 2014).

Também tem sido atribuído ao exercício efeitos sobre a transmissão sináptica periférica e central, pois ao se recrutar o músculo para a execução da atividade física, a junção neuromuscular se adapta, permitindo melhor difusão da acetilcolina na placa motora e, portanto, funcionando como mecanismo de remodelação sináptica (HADJ-SAID et al., 2011). Nos circuitos espinais, a manutenção do suporte neurotrófico e o fornecimento de informações aferentes para motoneurônios espinais pelo exercício têm ajudado a diminuir as alterações de plasticidade que ocorrem na medula espinal como a perda sináptica, principalmente de sinapse excitatória, assim como, reação microglial sobre o corpo neuronal que ocorrem após a lesão nervosa periférica (ARBAT-PLANA et al., 2015).

Entretanto, também, existem evidências que apresentam efeitos benéficos e deletérios do exercício na regeneração nervosa periférica e na reinervação muscular. Variações no tipo de lesão, no exercício aplicado, no tempo e intensidade de treinamento parecem ser os principais fatores determinantes destes efeitos (UDINA et al., 2011).

O exercício de baixa intensidade e não de alta intensidade potencializa a proliferação das células de Schwann, ao passo que, o exercício intenso forçado tende a ter um efeito prejudicial especialmente na função muscular, e o excesso de trabalho pode danificar os músculos parcialmente denervados (UDINA et al., 2011).

Não existe consenso na literatura sobre qual melhor seria o período de aplicação do exercício após a lesão nervosa periférica: na fase de denervação (primeiros dias após a lesão), na fase de reinervação (duas semanas após a lesão) (VAN-MEETEREN et al., 1997), na fase aguda ou crônica da lesão (TEODORI et al., 2011).

Em modelos experimentais de lesão por esmagamento do nervo isquiático, Herbinson et al. (1974), mostraram que a estimulação da atividade neuromuscular pelo

exercício deveria começar aproximadamente no período de duas semanas após a lesão. Uma vez que a reinervação funcional dos músculos dos membros posteriores é predominante no período de duas semanas após a lesão e o exercício antes deste período poderia ser prejudicial (HERBISON et al., 1973). Danos musculares, por exemplo, podem ocorrer durante o curso da reinervação quando o número de unidades contráteis ainda é muito pequeno e a intensidade do exercício é muito grande (2 horas de natação por dia) (HERBINSON et al., 1974).

O exercício de corrida na esteira de baixa intensidade a velocidade de 10 m/min por 30 minutos por um período de 2 a 4 semanas de treinamento, mostrou melhoras na recuperação funcional, maior número e diâmetro de fibras nervosas mielinizadas, assim como um efeito neuroprotetor do exercício contra o processo inflamatório, com diminuição de citocinas pró- TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (BOBINSKI et al., 2011).

Por outro lado, a atividade física começada imediatamente após a lesão do nervo ou nos estágios iniciais de denervação pode permitir maior aumento da resistência a fadiga e restauração das propriedades contráteis do musculo, melhorias essas que se mantêm ao longo do processo de reinervação (VAN MEETEREN et al., 1997).

Ao comparar o exercício iniciado em períodos diferentes após o esmagamento do nervo isquiático, Teodori et al. (2011), observaram que embora a natação quando iniciada 24 horas após a lesão permitia recuperação mais rápida aos animais do que quando iniciada 14 dias após, não houve diferenças significativas entre os dois protocolos. Resultados também não significativos foram encontrados em um protocolo de exercício em esteira realizado por Sobral et al., 2008, nestes mesmos períodos de lesão.

Por outro lado, Bonetti et al. (2015) e Cai, Na e Hwangbo (2015) observaram que o treino de equilíbrio e coordenação e o treino em esteira de baixa intensidade, respectivamente, iniciados nos primeiros dias após a lesão, acelerou a recuperação. Já no estudo de Ilha et al. (2007), o treino aeróbico de moderado a intenso iniciado na terceira semana após a lesão atrasou a recuperação.

## 1.5 Vibração

### 1.5.1 Bases físicas da vibração

A vibração é uma oscilação mecânica, isto é, uma alteração periódica da força, aceleração e deslocamento ao longo do tempo. Fisicamente ela significa uma oscilação forçada onde a energia é transferida de um sistema ou aparelho que produz a vibração para um ressonador (corpo humano ou partes do corpo). As oscilações são definidas por parâmetros como tipo de onda, amplitude (mm), frequência (Hz) e aceleração angular (g, onde g representa a aceleração da gravidade) (RITTWEGER, 2009). Conforme estes parâmetros, o modo de oscilação e o tempo de exposição de vibração, diferentes respostas neurofisiológicas podem ser observadas.

Durante a vibração, o corpo é acelerado, o que causa uma força de reação interna. Por não se constituir um corpo totalmente rígido, o corpo humano possui elementos móveis como músculos, tecidos moles, órgãos e fluidos (YUE; MESTER, 2002) que armazenam e liberam energia mecânica, funcionando fisicamente como um sistema massa-mola de amortecimento. Esse sistema é constituído principalmente pelos músculos e tendões que, conforme a amplitude, frequência e aceleração da vibração, responderão amortecendo, acumulando ou amplificando sua energia (RITTWEGER, 2009).

O corpo humano e seus órgãos individuais têm diferentes frequências naturais. Vibrações verticais na faixa de 5-10 Hz, por exemplo, geralmente causam ressonância no sistema torácico-abdominal, frequências de 10-30 Hz na região da cabeça, no membro superior e sistema urinário e de 60-90 Hz no globo ocular (RASMUSSEN, 1983). A transmissão de energia mecânica através do corpo causada por vibrações depende da postura corporal, da massa corporal e das contrações musculares. Nas plataformas comercializadas, as frequências normalmente variam de 5-60 Hz, e a ressonância de partes do corpo pode ocorrer (SONZA et al., 2015).

Durante a ressonância, as frequências de oscilação do corpo ou de suas estruturas são amplificadas. Isso significa maiores forças internas dentro do corpo, que podem gerar deslocamento de órgãos e outras estruturas e exercer uma pressão sobre tecidos próximos (RABEY et al., 2014). Se essas forças não forem amortecidas, elas podem causar sérios danos. Além disso, qualquer amortecimento mecânico ou fisiológico (musculoesquelético) levará a absorção de energia e gerará calor

(RITTWEGER, 2009). Oscilações que entram em ressonância tendem a serem mais prejudiciais, embora seus efeitos não sejam totalmente claros (RABEY et al., 2014).

Os dispositivos de vibração possuem diferentes mecanismos de geração de energia. Independentemente do tipo de dispositivo, os tecidos que se encontram mais próximos à fonte de vibração são mais estimulados. Como modalidade de exercício físico, a vibração é mais praticada na forma de vibração de corpo inteiro, através de plataformas oscilatórias (RITTWEGER, 2009).

Existem diferentes tipos de plataformas vibratórias comercializadas. Basicamente existem dois modos de vibração. A plataforma vibratória Galileo, por exemplo, produz uma vibração vertical, assíncronica ou pivotal nos hemisférios direito e esquerdo, onde as oscilações são transmitidas em torno de um eixo horizontal anteroposterior. A plataforma Power Plate, produz vibrações verticais síncronas, onde os hemisférios são vibrados simultaneamente (COCHRANE, 2011). Conforme a combinação destes dois modos e a transmissão das oscilações ao longo dos eixos ortogonais (x, y e z), diferentes outros modos de vibração tem sido produzidos nas plataformas atuais.

Nos estudos experimentais com vibração, não existe uma padronização das plataformas utilizadas. Elas podem ser fabricadas conforme as dimensões dos animais e apresentam oscilações alternadas, como as plataformas de Galileo (WIRTH et al., 2013; SCHWARZ et al., 2015; MANTHOU et al., 2017) ou serem adaptadas. Neste caso, os animais são colocados sobre gaiolas ou caixas acopladas em uma plataforma de oscilação vertical (BACZYK et al., 2013; LOCHYNSKI et al., 2013; BRAMLETT et al., 2014). Nos dois tipos de modelos, os animais são livres para deslocarem-se durante a vibração.

### 1.5.2 Bases neurofisiológicas da vibração como exercício físico

Durante muito tempo, a vibração tem sido associada aos danos causados durante a exposição ocupacional (RITTWEGER, 2009). Esses danos se caracterizam por vasculopatias e neuropatias periféricas (YOUAKIM, 2008; MATLOUB et al., 2005) e são associadas ao desequilíbrio de respostas dos sistemas imune e nervoso, com alterações neuroquímicas e estruturais no tecido nervoso e vascular periférico (para revisão ver: KRAJNAK et al., 2012).

A noção de que a vibração pode ser benéfica e ser usada como exercício e terapia é relativamente recente (RITTWEGER, 2009). Nazarov e Spivak (1985) foram os primeiros a aplicar a vibração como modalidade de treinamento. A partir de então, a vibração começou a ser investigada como modalidade de exercício para aumentar a atividade de força muscular, despertando, assim, o interesse de várias empresas comerciais (RITTWEGER, 2009).

Os benefícios no desempenho muscular supostamente ocorrem através da potencialização neurogênica dos reflexos espinais e da ativação muscular, através do reflexo tônico de vibração. Essa potencialização é responsável pelo aumento da função muscular, de forma semelhante aos resultados encontrados em várias semanas de treinamento convencional de resistência e força (COCHRANE, 2011).

Essa similaridade está relacionada às características da carga imposta pela vibração, que, como o fortalecimento, aumentam a carga gravitacional imposta ao sistema neuromuscular. Os programas de exercícios concebidos para aumentar a força são caracterizados pela realização de exercícios com um aumento da carga gravitacional. A vibração pode aumentar esta carga em até 14 vezes, ou seja, 14 vezes a aceleração da gravidade (14g). Essas formas de exercício produzem respostas adaptativas específicas nos músculos esqueléticos como aumento nas áreas de secção transversal das fibras musculares (CARDINALE; BOSCO, 2003).

A ação mecânica da vibração é produzir mudanças rápidas e curtas no comprimento do complexo músculo-tendão (CARDINALE; BOSCO, 2003), gerando perturbação dos receptores sensoriais. Como resultado, tem-se um efeito bidirecional do controle motor, envolvendo a ativação das fibras musculares e dos sinais sensoriais de propagação central, permitindo sua modulação (DUCHATEAU; ENOKA, 2002).

Durante a aplicação da vibração, ocorre uma descarga orientada das terminações primárias (Ia) e secundárias (II) dos fusos musculares. As terminações Ia são mais ativadas que as terminações II. Além dos fusos musculares, as aferências Ib dos órgãos neurotendíneos também são responsivas a vibração muscular. A descarga do fuso estimula os motoneurônios- $\alpha$ , através de vias monossinápticas (pelas aferências Ia) ou polissinápticas (pelas aferências II), causando contração muscular reflexa. Esse reflexo é conhecido como reflexo tônico de vibração. Durante a contração reflexa, as descargas das terminações dos fusos musculares diminuem e as aferências Ib dos órgãos neurotendíneos aumentam. O resultado é uma combinação cíclica entre contrações concêntricas e excêntricas (CARDINALE; BOSCO, 2003; RITTWEGER, 2009).



Cessada a vibração, os efeitos neuromusculares são contraditórios e envolvem: aumento ou diminuição na sensibilidade do reflexo de estiramento e inibição da musculatura antagonista através de neurônios inibitórios sobre as aferências Ia. Esses efeitos podem durar em minutos ou hora (CARDINALE; BOSCO, 2003).

A vibração é percebida não somente pelos fusos musculares, mas também pela pele, articulações e outras terminações sensitivas (CARDINALE; RITTWEGGER, 2006). Mecanorreceptores como de Meissner e Paccini, também são estimulados (SONZA et al., 2013). Todas essas estruturas sensoriais são capazes de perceber o estímulo vibratório e contribuir para facilitar aferências para neurônios motor-gama que reagem alterando a sensibilidade das terminações nervosas primárias (CARDINALE; RITTWEGGER, 2006).

Uma vez que o córtex motor somatossensorial primário e secundário constituem a unidade de processamento central de qualquer aferência do corpo (pele, músculos e articulações e outros), a vibração pode diretamente influenciar a atividade encefálica. Isso pode explicar, por exemplo, a sensação ilusória de movimento após a vibração. Os estímulos vibratórios ao influenciar o estado excitatório de estruturas periféricas e centrais podem facilitar movimentos voluntários subsequentes (CARDINALE; RITTWEGGER, 2006).

Juntos, estes efeitos têm permitido o uso da vibração de corpo inteiro como modalidade para melhorar o desempenho muscular, a força muscular e a flexibilidade em indivíduos saudáveis (CHANOU et al., 2012). Ela, também, tem sido utilizada no treino de marcha e equilíbrio em idosos (POZO-CRUZ et al., 2012) e como intervenção terapêutica para redução da dor neuropática periférica (HONG; BARNES; KESSLER, 2013; KESSLER; HONG, 2013), da espasticidade, para treino da propriocepção e como possível meio de modulação da excitabilidade motora cortical em pacientes com: acidente vascular encefálico, paralisia cerebral, Parkinson e lesão medular (POZO-CRUZ et al., 2012).

Além dos efeitos diretos sobre a atividade neuromuscular, a vibração, também, tem apresentado resultados sobre a fisiologia cardiovascular como melhora do fluxo sanguíneo e da oxigenação da musculatura do membro inferior de pacientes com lesão medular (HERRERO et al., 2010). Entretanto, estes efeitos não estão totalmente claros, uma vez que, por exemplo, em indivíduos saudáveis, tem sido observado tanto aumento (GAMES; SEFTON, 2011) como diminuição (SONZA et al., 2015) na temperatura corporal após a vibração.

Entretanto, apesar do seu amplo uso no esporte, no exercício e na saúde, as respostas fisiológicas da vibração permanecem não totalmente claras, uma vez que diversos são os protocolos de treinamento aplicados com a vibração (COCHRANE, 2011). Além disso, ela pode oferecer riscos nocivos sobre o corpo humano quando utilizada de forma inadequada principalmente porque seus efeitos dependem da forma em que seus parâmetros (frequência, amplitude, aceleração e tempo) são aplicados (CHANOU et al., 2012).

Estudos em modelos animais têm sido utilizados a fim de se tentar entender como a vibração atua sobre o sistema neuromuscular como, por exemplo, sobre os mecanismos de excitabilidade e alterações morfológicas nas unidades motoras rápidas e lenta e suas implicações sobre a força e resistência muscular (BACZYK et al., 2013;; LOCHYNSKI et al., 2013; METTLACH et al., 2014).

Estudos experimentais em modelos de lesão nervosa têm demonstrado que a vibração possui efeitos controversos como neuroproteção na doença de Parkinson (ZHAO et al., 2014), prejuízo nas sinapses e retardo da recuperação funcional de animais com lesão medular, conforme o período da lesão em que os animais são treinados (WIRTH et al., 2013; BRAMLETT et al., 2014;SCHWARZ et al., 2015; MANTHOU et al.,2017).

## 2 JUSTIFICATIVA

Traumas ou lesões mecânicas estão entre as causas mais frequentes das lesões que atingem o sistema nervoso periférico (SVENNIGSEN; DAHLIN, 2013). Embora após uma lesão, a capacidade de regeneração do nervo periférico seja superior à do sistema nervoso central, a recuperação completa é bastante infrequente (HOUSCHYAR et al., 2016).

Entre as principais lesões experimentais estudadas, a axonotmese é a que mais se aproxima das condições clínicas frequentemente apresentadas pelos pacientes. Nestes estudos, o modelo experimental de esmagamento do nervo isquiático é o que produz confiavelmente a axonotmese (SAVASTANO et al., 2014). A utilização deste nervo justifica-se pela facilidade de seu acesso cirúrgico (GEUNA, 2015) e por este ter estrutura e distribuição anatômica similar à de humanos (TOS et al., 2009). Além disso, a taxa de regeneração nervosa em roedores (3-4 mm/dia) é maior que em humanos (1mm/dia) e a distância a ser regenerada é menor, permitindo que a regeneração do rato seja mais rápida (TONGE; GOLDING, 1993), facilitando, na prática científica, a análises de parâmetros de recuperação sensorial, motora e estrutural, ao longo do tempo (VAREJÃO et al., 2001).

Estudos em animais com lesão por esmagamento do nervo têm mostrado que o exercício físico é uma das estratégias terapêuticas que tem sido utilizada a fim de melhorar a recuperação funcional (ARBAT-PLANA et al., 2015). Desse modo, diferentes modalidades de exercício como treino de equilíbrio e coordenação (BONETTI et al., 2011), treino em esteira (CAI; NA; HWANGBO, 2015), treino de resistência (ILHA et al., 2007) e natação (TEODORI et al., 2011), tem sido investigadas.

Atualmente, a vibração de corpo inteiro tem sido uma modalidade de exercício que tem ganhado destaque na clínica e no treinamento funcional (WUNDERER; SCHABRUM; CHIPCHASE, 2008). Entretanto, não estão totalmente esclarecidos os efeitos dos estímulos vibratórios sobre o corpo (CHANOU et al., 2012) e não foram encontrados na literatura, estudos que avaliaram a vibração em modelos de lesão nervosa periférica.

Assim, devida à importância do exercício físico na regeneração nervosa periférica, e o crescente uso da vibração como modalidade de treinamento físico, o

presente estudo propõe-se a analisar os efeitos da vibração sobre a morfofuncionalidade do nervo isquiático após sua lesão por esmagamento, em um modelo experimental.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Analisar comparativamente os efeitos de dois protocolos de treinamento físico por vibração de corpo inteiro sobre a morfofuncionalidade do nervo isquiático após lesão por esmagamento do nervo isquiático em modelo experimental.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar comparativamente os efeitos de dois protocolos de treinamento físico por vibração de corpo inteiro (iniciados 3 dias e 10 dias após a lesão) sobre a função locomotora dos membros posteriores, utilizando o índice de funcionalidade do nervo isquiático, após lesão por esmagamento do nervo isquiático.
- Avaliar comparativamente os efeitos de dois protocolos de treinamento físico por vibração de corpo inteiro (iniciados 3 dias e 10 dias após a lesão) sobre a função sensoriomotora, utilizando a análise de testes de coordenação específicos: teste da escada horizontal e teste da barra estreita, após lesão por esmagamento do nervo isquiático.
- Analisar comparativamente os efeitos de dois protocolos de treinamento físico por vibração de corpo inteiro (iniciados 3 dias e 10 dias após a lesão) sobre a morfometria das fibras do nervo isquiático após lesão por esmagamento.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Modelo animal e grupos experimentais

Foram utilizados 53 ratos Wistar machos, com dez semanas de vida, com peso variando de 250 a 350g, oriundos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS.

Os animais foram tratados conforme a Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008 que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Eles foram mantidos em caixas de polipropileno cobertas por maravalha que continham no máximo quatro animais por caixa, respeitando-se a Resolução Normativa N.15 de 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada ( $20 \pm 2$  °C), ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*.

Após três dias de ambientação no biotério, os animais foram aclimatizados na área de teste e treinamento no Laboratório de Histofisiologia Comparada do ICBS/UFRGS e foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais:

- 1) Grupo controle (C; n=10): animais sem intervenção.
- 2) Grupo sham (SH; n=10): animais submetidos ao procedimento cirúrgico, porém sem lesão do nervo isquiático.
- 3) Grupo lesionado não treinado (NT; n=11): animais submetidos ao procedimento cirúrgico, com lesão do nervo isquiático.
- 4) Grupo lesionado treinado com vibração de corpo inteiro 3 dias após a lesão (V3; n=11): animais submetidos ao procedimento cirúrgico, com lesão do nervo isquiático e que iniciaram o treinamento físico com vibração 3 dias após a lesão.
- 5) Grupo lesionado treinado com vibração de corpo inteiro 10 dias após a lesão (V10; n=11): animais submetidos ao procedimento cirúrgico, com lesão do nervo isquiático e que iniciaram o treinamento físico com vibração 10 dias após a lesão.

## 4.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram, inicialmente, pesados e anestesiados com uma dose intraperitoneal de cetamina (90 mg/Kg)(Vetbrands, Brasil) e xilazina (15mg/kg) (Vetbrands, Brasil). Em seguida foi realizada tricotomia da área dorsolateral da coxa direita dos animais e estes foram posicionados em decúbito ventral, sobre uma mesa cirúrgica aquecida (*HeatPad* para Esterotáxico – EEF 422, Insight, Brasil) a temperatura de 37,5°C.

A intervenção foi iniciada pela antisepsia da pele com álcool iodado a 2%. Foi realizada, em seguida, uma incisão longitudinal de 3 cm, em relação ao maior eixo do membro posterior direito, seccionando-se a pele e a tela subcutânea correspondentes. Usando-se como referência o trocânter maior da região medial da coxa, onde através da exposição dos músculos do quadril e da coxa, e seu divulsionamento, foi-se exposto o nervo isquiático. A lesão nervosa do nervo isquiático por esmagamento, em sua emergência logo após o limite inferior do músculo glúteo máximo foi realizada através de uma pinça lisa (1 mm de espessura) comprimida por uma pinça hemostática com força máxima por 30 segundos (BRIDGE et al., 1994; MALYSZ et al., 2010). O local da lesão foi identificado através de um ponto com fio 8-0 de seda não absorvível no epineuro e a incisão cirúrgica foi então suturada com sutura em 4-0 nylon (Somerville, Brasil) e desinfetada com álcool iodado a 2%.

#### 4.3 Treinamento físico com vibração:

O treinamento físico com vibração foi realizado em uma plataforma vibratória (TBS 100A Total Image Fitness Inc; CA), adaptada para o uso em animais (Fig. 1). A adaptação incluiu a colocação de blocos de cimento (cada um com cerca de 30Kg) e acoplamento de 2 caixas de acrílico (21 cm de largura e 23,5 cm de comprimento) para treino de 4 animais simultaneamente.



Figura 1: Imagem da plataforma vibratória (TBS 100A Total Image Fitness Inc; CA) adaptada para o treinamento dos animais.

Em dias diferentes após o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático, foram iniciados os treinamentos com vibração dos grupos V3 (após 3 dias) e V10 (após 10 dias). Animais dos grupos C, SH e NT foram posicionados sobre a plataforma desligada, a fim de que as manipulações experimentais fossem as mesmas para todos os grupos. O protocolo de treinamento foi realizado cinco vezes por semana por cinco semanas, conforme estudos experimentais anteriores (BACZYK et al., 2013; LOCHYNSKI et al., 2013).

Os parâmetros utilizados para o treinamento foram: cinco *trials* compostos por 1 minuto na frequência de 15 Hz seguida a 2 minutos de frequência de 30 Hz, conforme Wirth et al. (2013), intercalados por 1 minuto e 30s de repouso. A amplitude utilizada foi de 2 mm e o modo de oscilação foi espiral, considerado o modo de melhor adaptação (SONZA et al., 2013). Neste modo, a vibração apresenta um movimento suave movimento elíptico no plano horizontal. Esses parâmetros também foram determinados devido às limitações do equipamento e, por se aproximar dos protocolos funcionais e fisiológicos de disparo dos motoneurônios espinais a seus respectivos músculos (BACZYK et al., 2013; LOCHYNSKI et al., 2013; WIRTH et al., 2013).



A acurácia das frequências de vibração do equipamento foram medidas usando um giroscópio 3D, modelo GDM-3X2 (MicroStrain, EUA) e através de análise com a transformada de Fourier (FFT), foram encontradas as frequências utilizadas nesse estudo. O acelerômetro foi fixo na parte central do bloco, no local aproximado de colocação dos animais. Para medida da amplitude do equipamento, uma caneta laser foi fixada na parte central do bloco; após projeção na parede de um ponto de 0,5 mm de diâmetro, foi realizada uma marcação na parede da oscilação deste ponto na frequência desejada e foi encontrada uma amplitude de 2 mm pico-a-pico.

#### 4.4 Testes comportamentais

Inicialmente, durante um período de 7 dias, os animais foram previamente adaptados aos testes comportamentais utilizados neste estudos: Índice funcional do nervo isquiático (IFI), Teste da escada horizontal (EH) e Teste da barra estreita. Após o procedimento cirúrgico, estes testes foram realizados duas vezes por semana nos seguintes dias pós-operatórios (p.o): 6°, 9°, 13°, 16°, 20°, 23°, 27°, 30°, 33° e 36° dias p.o (Testes IFI e EH) e 7°, 10°, 14°, 17°, 21°, 24°, 28°, 31°, 35° p.o (Teste BE) (Fig. 2).

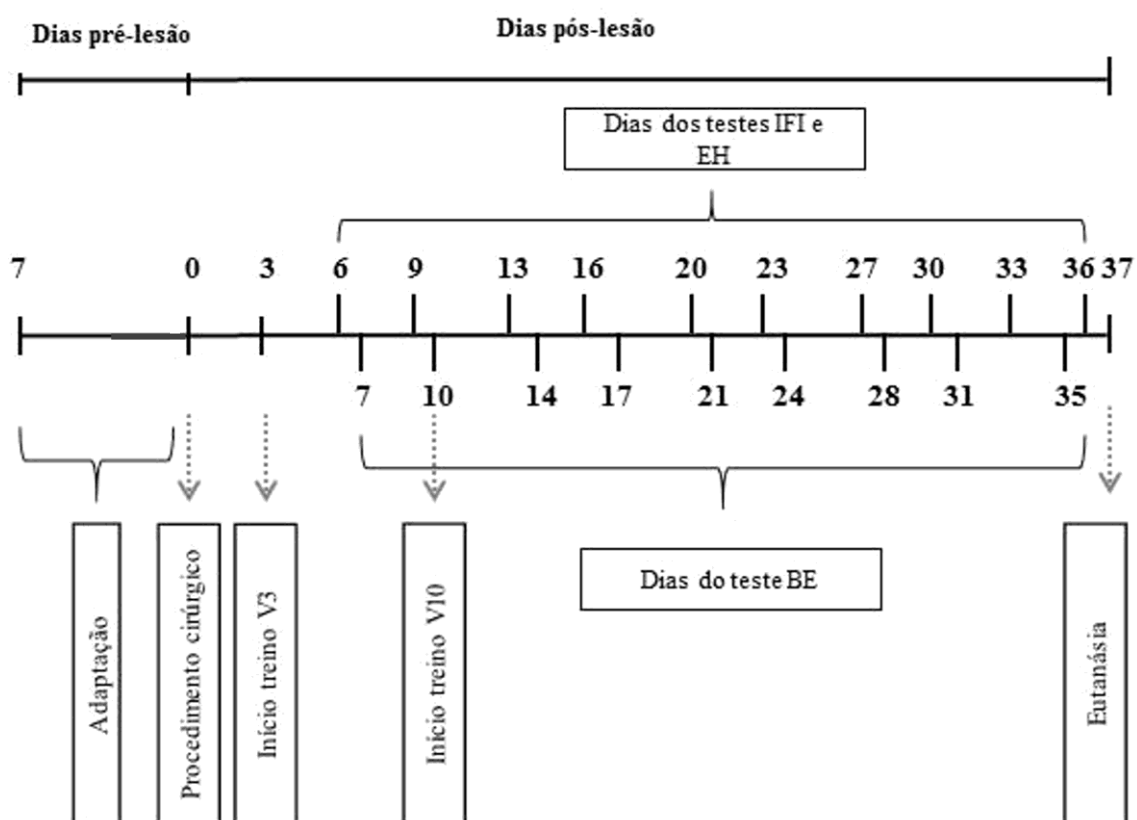


Figura 2: Linha do tempo representando o protocolo experimental. Adaptação = 7 dias prévios a lesão. IFI=Índice funcional do isquiático. BE= Barra estreita. EH = Escada horizontal. V3= grupo lesionado treinado com vibração iniciada 3 dias após a lesão. V10=grupo lesionado treinado com vibração iniciada 10 dias após a lesão.

#### 4.4.1 Índice funcional do nervo isquiático (IFI)

O Índice funcional do nervo isquiático (IFI) é um método quantitativo e reprodutível da condição funcional do nervo isquiático de ratos. Ele é usado para avaliação do grau de lesão e da sua recuperação (MONTE-RASO et al., 2008) e foi desenvolvido primeiramente por Medinaceli; Freed e Wyatt (1982), que combinaram medidas de parâmetros morfológicos da impressão da pegada do membro posterior dos animais em uma fórmula cujo valor final representa o índice.

Para cálculo do índice, neste estudo, os animais foram previamente adaptados (por sete dias) a caminharem sobre uma folha branca de papel disposta em uma passarela de 100 cm de comprimento e 8,5 cm de largura, cuja extremidade final continha uma caixa escura que servia como estímulo para o animal chegar à extremidade da passarela. Os membros posteriores dos animais foram pintados com tinta de carimbo preta, permitindo assim, a impressão das pegadas sobre a folha, através das quais, foram realizadas medições no membro posterior normal (não lesionado) e membro posterior experimental (lesionado) do animal (KORB et al., 2009).

Com o auxílio de uma régua milimetrada, as seguintes medições foram realizadas: distância entre a extremidade central do terceiro dedo ao calcanhar (comprimento da pegada: PL), distância entre as extremidades central do primeiro ao quinto dedo (abertura total dos dedos: TS) e distância entre as extremidades central do segundo ao quarto dedo (abertura dos dedos intermediários: IT) (SARIKCIOGLU et al., 2009). Os valores intermediários de PL, TS e IT de três pegadas consecutivas de cada membro posterior, foram aplicados à fórmula:  $-38,3 (EPL - NPL) / NPL + 109,5 (ETS - NTS) / NTS + 13,3 (EIT - NIT) / NIT - 8,8$ , onde E significa membro experimental e N membro normal.

Valores entre -12 a 12 representam excelente função, de -13 a -37 função boa, de -38 a -62 função média, -63 a -87 função insatisfatória, -88 a -112 déficit completo e de -113 a -137 pior que o déficit completo (MEDINACELI, 1995).

#### 4.4.2 Teste da Escada Horizontal (EH)

O Teste da Escada Horizontal é um teste que avalia déficits no controle motor fino descendente durante a caminhada do animal sobre uma escada horizontal com degraus dispostos em um padrão de distância irregular. Durante sua execução, ele exige a coordenação dos membros anteriores e posteriores assim como o controle voluntário do movimento, permitindo a detecção de déficits não aparentes durante a locomoção normal (METZ et al.,2000).

Para realização deste teste foi utilizado um aparato (escada) de 100 cm de comprimento e 5 cm de largura, constituído de duas paredes acrílicas paralelas intercaladas por degraus de metal com 3 mm de diâmetro com distância mínima de 1 cm entre os mesmos. A escada foi posicionada a 30 centímetros do solo, na extremidade final havia uma caixa escura. Sob a escada encontrava-se um espelho para facilitar a análise das passadas. A fim de que fossem evitadas compensações de aprendizagem motora, a distância entre os degraus era variada aleatoriamente entre 1cm a 5 cm para cada dia de realização do teste (METZ; WHISHAW, 2002) (Fig.3).

Foram realizadas três repetições de marcha ao longo de toda a escada por animal, as quais foram gravadas através de uma câmera posicionada lateralmente ao aparato. Os valores de erros de posicionamento do membro lesionado (membro posterior direito), de cada repetição foram tabulados e suas médias foram analisadas estatisticamente.



Figura 3: Aparato utilizado para o Teste da Escada Horizontal.

#### 4.4.3 Teste Caminhada da Barra Estreita (BE)

O Teste de Caminhada da Barra Estreita é um teste sensoriomotor usado para análise da coordenação motora fina, associada, principalmente, ao controle do equilíbrio. Ele examina essencialmente a capacidade do animal em permanecer na posição vertical ou andar sobre uma barra elevada e relativamente estreita (LUONG et al.,2011).

O teste consistiu na caminhada do animal sobre uma barra estreita de superfície plana, com 1m de comprimento e 2,6 cm de largura, elevada a 30 cm do solo. Em uma de suas extremidades encontrava-se uma caixa escura para a qual o animal era ensinado a chegar ao final da caminhada (BONETTI et al.,2011). Sob a barra encontrava-se um espelho para maior análise das passadas. Foram realizadas três repetições de caminhada sobre toda barra por animal, as quais foram gravadas através de uma câmera posicionada lateralmente a barra (Fig.4).

Os valores de erros de posicionamento do membro posterior lesionado (membro posterior direito) durante as caminhadas foram tabulados e suas médias foram analisadas estatisticamente.

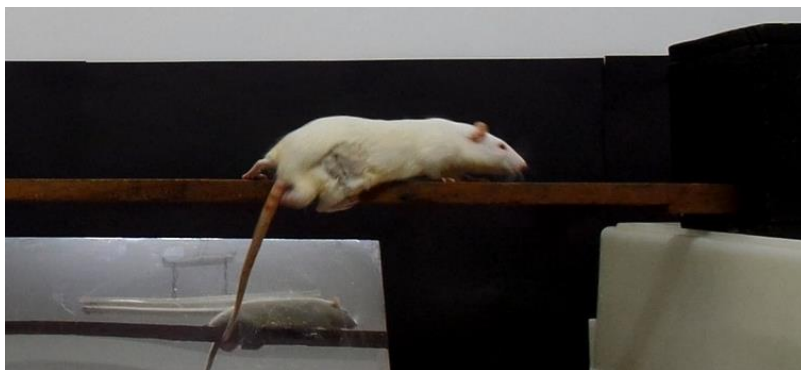


Figura 4: Aparato utilizado para Teste da Barra Estreita

#### 4.5 Análises histológica e morfométrica do nervo isquiático

Após um período de 24h da última sessão de treino, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (50mg/kg; Cristália, Brasil), injetado com 1000 IU de heparina (Cristália, Brasil) e transcardialmente perfundidos com 300 mL de solução salina e, posteriormente, com 300 mL de solução de paraformaldeído 4,0% (Reagen, Brasil) diluído em tampão fosfato (TF) 0,1M, pH 7,3.

Em seguida, um segmento do nervo isquiático direito de aproximadamente 2mm de comprimento foi coletado, 1 mm distal da área de lesão nervosa. As amostras coletadas foram mantidas em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO) em TF 0,1M, pH 7,3 por 1h a temperatura ambiente e por 15 dias a 4°C. Após, elas foram lavadas em TF 0,1M, pH 7,3 (3 lavagens de 30 minutos), pós fixadas em tetróxido de ósmio 1% (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO), diluído em TF 0,1M, por 1 h à temperatura ambiente e novamente lavadas em TF 0,1M, pH 7,3 por 45min (3 lavagens de 15 minutos cada). Posteriormente, o material foi desidratado em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%).

A seguir, o material foi pré-embebido em resina (Durcupan; ACM-Fluka, Suíça) diluída em acetona (3:1) por 2h, e em resina diluída 50% em acetona por *overnight*. Após, foi embebido por 24h em resina 100%. As amostras foram incluídas em resina 100% e levadas a estufa (68°C) por 48-72h para polimerização. Foram então, realizados cortes semifinos (900nm) em um Ultramicrotomo (MT 600-XL, RMC, Tucson, AZ), com navalhas de vidro. As lâminas contendo os cortes semifinos foram coradas com azul de toluidina 1% (Merck, Alemanha).

Imagens dos cortes transversais do segmento distal do nervo foram então capturadas e digitalizadas, utilizando-se do microscópio (Eclipse E-600; Nikon, Japan), acopladas a uma câmera CCD (Pro-Series) de alta performance e processadas com o programa Image-Pro Plus, versão 6.0 (Media Cybernetics, EUA). Foram escolhidas, aleatoriamente, 6 imagens de cada corte transversal (3 imagens da periferia e 3 imagens do centro de cada nervo) com aumento inicial de 100x com posterior ampliação de 200%. Para a avaliação morfométrica, o total de área avaliada do segmento distal do nervo isquiático foi a soma das seis áreas randomicamente selecionadas (4742,4  $\mu\text{m}^2$  no total).

As medidas morfométricas analisadas foram: densidade de fibras mielinizadas (número de fibras mielinizadas/mm<sup>2</sup>), porcentagem de área total ocupada por fibras

mielinizadas (%), porcentagem de área ocupada pelo endoneuro (%), área média das fibras mielinizadas ( $\mu\text{m}^2$ ), área média dos axônios das fibras mielinizadas ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetro médio das fibras mielinizadas ( $\mu\text{m}$ ), diâmetro médio dos axônios das fibras mielinizadas ( $\mu\text{m}$ ), espessura média da bainha de mielina ( $\mu\text{m}$ ) (MALYSZ et al., 2010) e grau de mielinização (g), obtido pelo quociente do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra (BONETTI et al., 2015).

Através da divisão entre o número de fibras e a área total analisada foi estimada a densidade de fibras mielinizadas e pela soma de todas as áreas das fibras nervosas mielinizadas, foi calculada a área total ocupada por estas fibras e calcular a porcentagem da área total analisada (100%), onde, deduzindo-se esta porcentagem da área total analisada foi possível estimar a porcentagem de área ocupada pelo endoneuro. Os diâmetros dos axônios e das fibras foram estimados a partir da área dos axônios e fibras correspondentes, onde seu valor foi convertido para diâmetro de um círculo com a área equivalente (MALYSZ et al., 2010; BONETTI et al., 2015).

#### 4.6 Análise estatística

Os testes comportamentais foram analisados conforme modelo de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) para análise de dados longitudinais seguidos por *post hoc* Bonferroni ( $P < 0,05$ ). A análise morfométrica foi realizada através de ANOVA *one-way*, *post hoc* Bonferroni ( $P < 0,05$ ). Os dados foram analisados através do software SPSS 22.0 (*Statistical Package for the Social Sciences, Inc.; Chicago USA*).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Testes comportamentais

#### 5.1.1 Índice Funcional do Nervo Isquiático – IFI

Os grupos não lesionados (C e SH) apresentaram valores de IFI dentro a faixa de normalidade, variando entre -6 e -12 e sem diferenças significativas entre os mesmos ( $P>0,05$ ). Os grupos de animais lesionados apresentaram ao longo de todo experimento valores de índice significativamente piores que os atingidos pelos grupos não lesionados ( $P<0,05$ ). Percebe-se que, nestes grupos, houve aumento dos valores do IFI com a melhora da recuperação ao longo do tempo ( $P<0,05$ ), porém sem atingir valores semelhantes aos dos grupos não lesionados são final do protocolo experimental (Fig.5).

Analisando-se comparativamente os valores dos IFI entre os grupos de animais lesionados, foi constatado que no 13º p.o, os animais do grupo V10 apresentaram valores de IFI ( $-107,89\pm 3,28$ ) significativamente menores que os apresentados pelos grupos NT ( $-77,79\pm 3,23$ ;  $P=0,000$ ) e V3 ( $-88,98\pm 2,99$ ;  $P=0,000$ ), representando assim uma pior recuperação funcional no grupo V10 (dados não apresentados na figura). No 16º dia p.o, o grupo V10 continuou a ter valores menores ( $-75,40\pm 4,42$ ) apenas em relação aos atingidos pelo grupo de animais lesionados não treinados (NT;  $-49,06\pm 1,98$ ;  $P=0,000$ ). Não existiram diferenças significativas entre V3 ( $-65,42\pm 6,43$ ) e V10 ( $-75,4\pm 4,42$ ) neste dia ( $P>0,05$ ). Entre o 20º e o 30º dia p.o, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de animais lesionados ( $P>0,05$ ; dados não apresentados na figura). No 33º p.o, os animais do grupo V10 ( $-38,77 \pm 3,8$ ) apresentaram valores de IFI menores que os apresentados pelos animais dos grupos V3 ( $-23,45 \pm 3,29$ ;  $P=0,023$ ) e NT ( $-23,12 \pm 2,31$ ;  $P=0,004$ ), representando assim uma pior recuperação funcional no grupo V10 (dados não apresentados na figura). Ao final do protocolo experimental, todos os grupos de animais lesionados apresentaram valores de IFI semelhantes ( $P>0,05$ ; Fig.5).



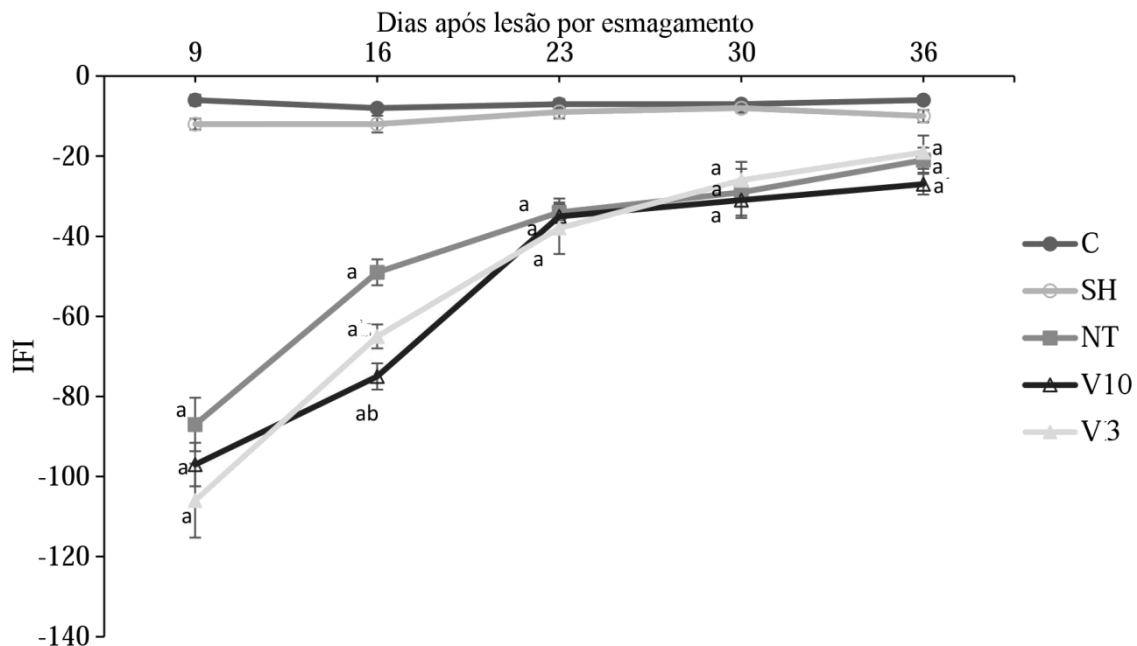


Figura 5: Gráfico apresentando os dados do índice funcional do isquiático, (IFI) avaliado após a lesão por esmagamento do nervo isquiático para os grupos do estudo: controle (C), *sham* (SH), lesionado não treinado (NT), lesionado treinado com vibração iniciada 3 dias após a lesão (V3) e lesionado treinado com vibração iniciada 10 dias após a lesão (V10). a  $P < 0,05$  vs C e SH. b  $P < 0,05$  vs NT. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Estes resultados indicam que nos animais lesionados houve uma recuperação funcional progressiva ao longo do protocolo experimental, sem, no entanto, atingir recuperação funcional completa. Em comparação com animais lesionados não treinados, os animais lesionados que iniciaram o treinamento 10 dias após a lesão tiveram uma pior recuperação funcional evidenciada em dias específicos do período pós-operatório (13<sup>o</sup>, 16<sup>o</sup> e 33<sup>o</sup> dia p.o).

### 5.1.2 Teste da Escada Horizontal (EH)

Os grupos não lesionados (C e SH) apresentaram uma média de 0,2 a 0,3 erros de posicionamento do membro lesionado, ao longo das avaliações, sem diferenças significativas entre estes grupos ( $P>0,05$ ). Os grupos de animais lesionados apresentaram valores significativamente maiores (maior número de erros) quando comparados aos grupos não lesionados ( $P<0,05$ ; Fig.6).

Analisando, comparativamente, os valores dos grupos lesionados em cada dia de p.o, foi verificado que não existiram diferenças significativas entre os mesmos, exceto no 16º dia p.o., onde o grupo V10 ( $1,23 \pm 0,09$ ) teve maior número de erros que o grupo NT ( $0,77 \pm 0,12$ ;  $P=0,018$ ). Neste mesmo dia não foram encontradas diferenças entre os grupos V3 ( $1,33 \pm 0,22$ ) e V10 ( $1,23 \pm 0,09$ );  $P>0,05$ ; Fig.6).

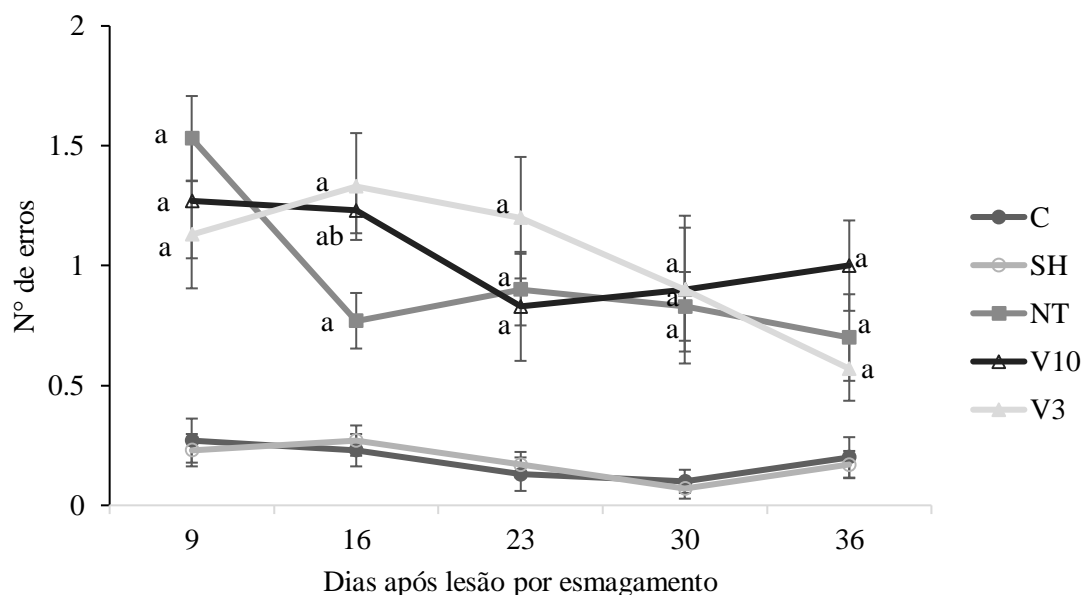


Figura 6: Gráfico representando o número médio de erros durante o Teste da Escada Horizontal em diferentes dias após a lesão por esmagamento do nervo isquiático para os grupos do estudo: controle (C), sham (SH), lesionado não treinado (NT), lesionado treinado com vibração iniciada 3 dias após a lesão (V3) e lesionado treinado com vibração iniciada 10 dias após a lesão (V10). a  $P<0,05$  vs C e SH. b  $P<0,05$  vs NT. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Estes resultados indicam que os animais lesionados tiveram uma recuperação funcional progressiva ao longo do protocolo experimental, sem, no entanto, atingir a recuperação completa. Adicionalmente, o grupo treinado que iniciou a vibração 10 dias após a lesão apresentou maior déficit funcional no 16º dia após a lesão, corroborando com os dados do IFI.

### 5.1.3 Teste da Barra Estreita (BE)

Os grupos não lesionados (C e SH) apresentaram valores médios de 0,07 a 0,2 erros de posicionamento do membro lesionado, ao longo do tempo, sem diferenças significativas entre eles ( $P>0,05$ ). Os três grupos de animais lesionados apresentaram valores significativamente maiores (maior número de erros) até o 28º dia p.o., quando comparados aos grupos C e SH ( $P<0,05$ ). Nas avaliações seguintes (31º e no 35º dia p.o) foi possível identificar que os grupos lesionados V3 e NT apresentaram recuperação funcional completa ( $P>0,05$  em relação aos grupos não lesionados). Dessa forma, no 35º dia p.o, apenas o grupo V10 apresentou diferença significativa ( $P<0,05$ ) em relação a todos os outros grupos.

Analisando-se comparativamente os grupos lesionados, no 17º dia p.o, o grupo V10 apresentou maior número de erros ( $5,14\pm 0,5$ ) que NT ( $2,0\pm 0,2$ ) e V3 ( $3,2\pm 0,7$ ) ( $P<0,05$ ; dados não representados na figura). No 21º e 24º dia p.o, não existiram diferenças significativas entre estes grupos. No 28º dia p.o os animais do grupo V10 apresentaram significativamente maior número de erros que NT ( $P<0,05$ ; Fig.7).

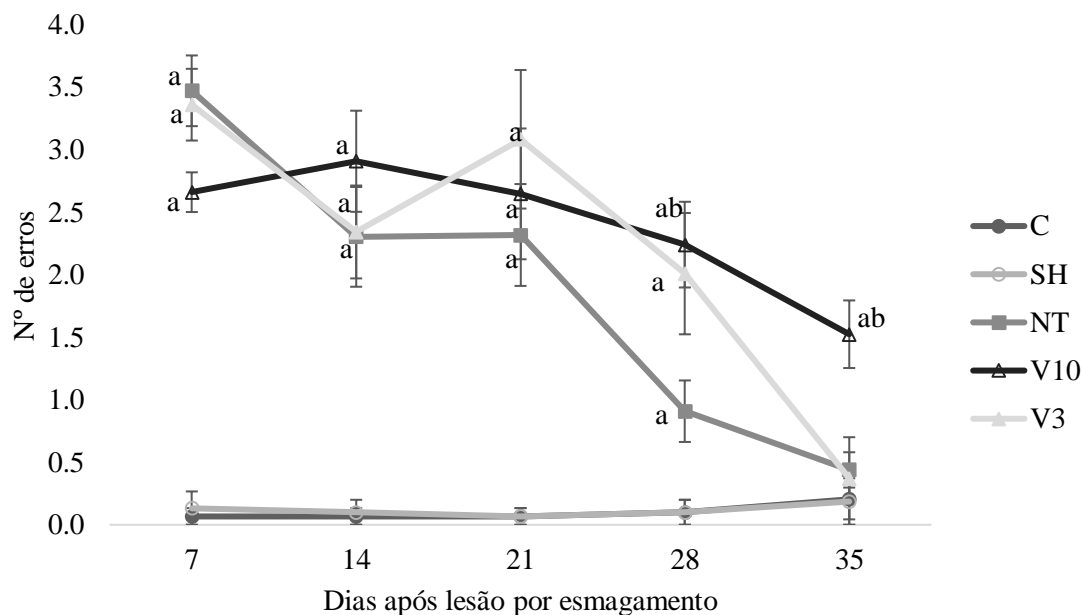


Figura 7: Gráfico representando o número médio de erros durante o Teste da Barra Estreita conforme os dias após a lesão por esmagamento do nervo isquiático para os grupos do estudo: controle (C), *sham*(SH), lesionado não treinado (NT), lesionado treinado com vibração iniciada 3 dias após a lesão (V3) e lesionado treinado com vibração iniciada 10 dias após a lesão (V10). a  $P < 0,05$  vs C e SH. b  $P < 0,05$  vs NT. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Estes resultados nos mostram que os animais lesionados tiveram uma recuperação funcional progressiva ao longo do protocolo experimental e, que ao final do treinamento, os grupos NT e V3 atingiram a recuperação funcional completa enquanto que o grupo V10 permaneceu com déficit funcional.

## 5.2 Análises histológica e morfométrica do nervo isquiático

Os grupos C e SH apresentaram padrão histológico semelhante: concentração de fibras mielinizadas por toda a área analisada, fibras nervosas amielínicas e células de Schwann envoltas por tecido conjuntivo (endoneuro).

Os grupos NT, V3 e V10, apresentaram características histológicas de incompleta regeneração nervosa: predominância de fibras mielinizadas menores dispersas pela área analisada, presença de tecido degenerativo e restos celulares, envoltos por um endoneuro aparentemente mais abundante que os grupos C e SH (Fig. 8).

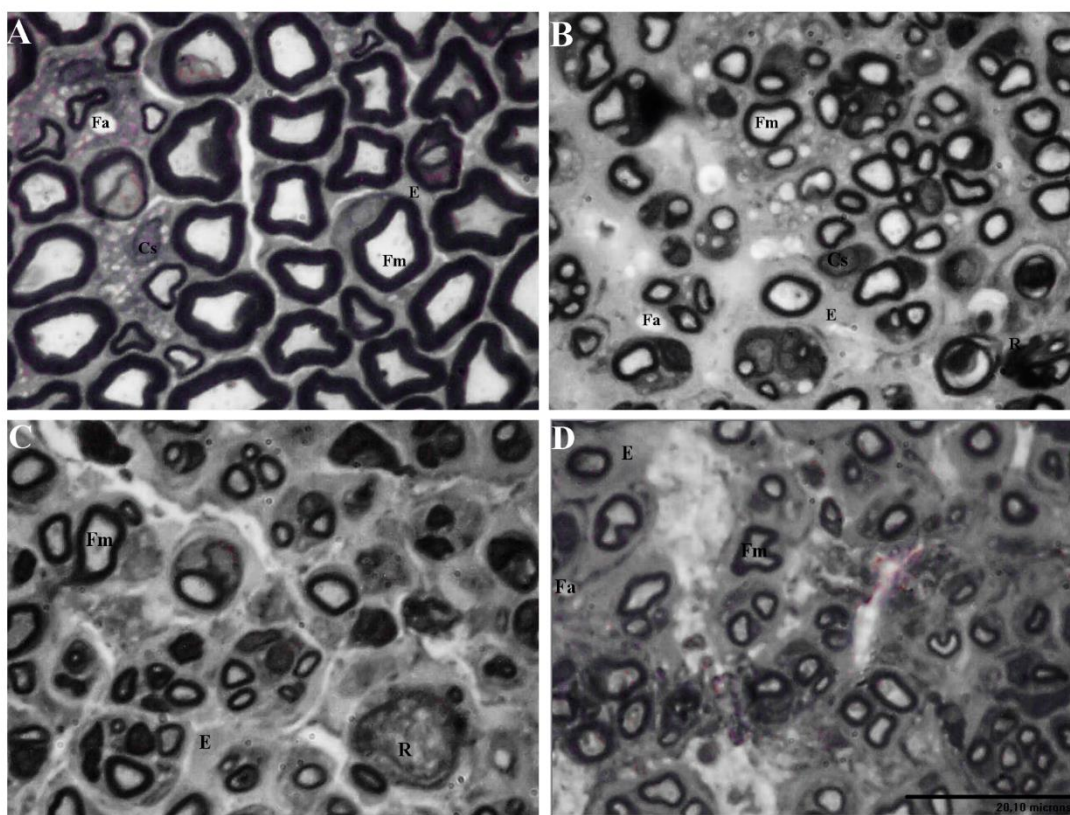


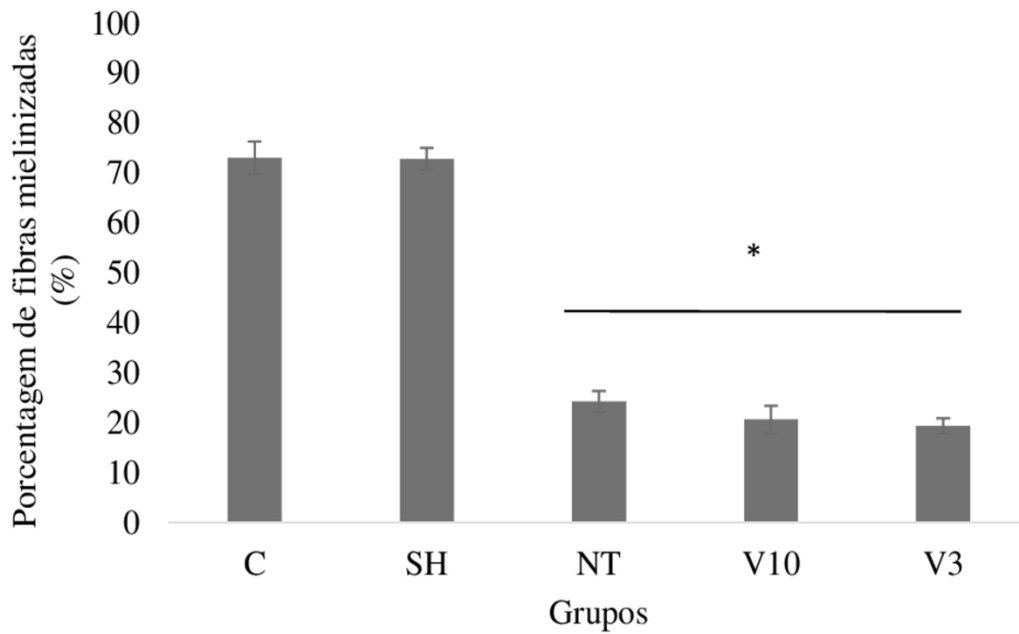
Figura 8: Imagens digitalizadas de cortes semifinos transversais da porção distal do nervo isquiático corados com azul de toluidina. A: Grupo controle (C). B: Grupo lesionado não treinado (NT). C: Grupo lesionado treinado com vibração iniciada 3 dias após a lesão (V3). D: Grupo lesionado treinado com vibração iniciada 10 dias após a lesão (V10). Fa = fibra amielínica. Fm = fibra mielínica. Cs = célula de Schwann. E = Endoneuro. R = restos celulares (tecido em degeneração). Barr = 20 $\mu$ m

### 5.2.1 Análise morfométrica

No que se refere a densidade de fibras mielinizadas por área total analisada do nervo, os grupos de animais não lesionados (C e SH) apresentaram respectivamente valores de  $14092,7 \pm 780,7$  fibras/mm<sup>2</sup> e  $12440,9 \pm 583,8$  fibras/mm<sup>2</sup>. A densidade de fibras mielinizadas para os animais com lesão foi de:  $16587,9 \pm 780,8$  fibras/mm<sup>2</sup> para o grupo NT,  $13881,9 \pm 1339,6$  fibras/mm<sup>2</sup> para o grupo V3 e  $14092,7 \pm 2424,7$  fibras/mm<sup>2</sup> para o grupo V10. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

A porcentagem de área ocupada por fibras mielinizadas foi menor nos grupos NT, V3 e V10 em comparação aos grupos não lesionados ( $P < 0,05$ ). Esses grupos também apresentaram maior porcentagem de área ocupada por fibras amielínicas, endoneuro e vasos sanguíneos, em comparação aos grupos não lesionados ( $P < 0,05$ ) (Fig.9).

A



B

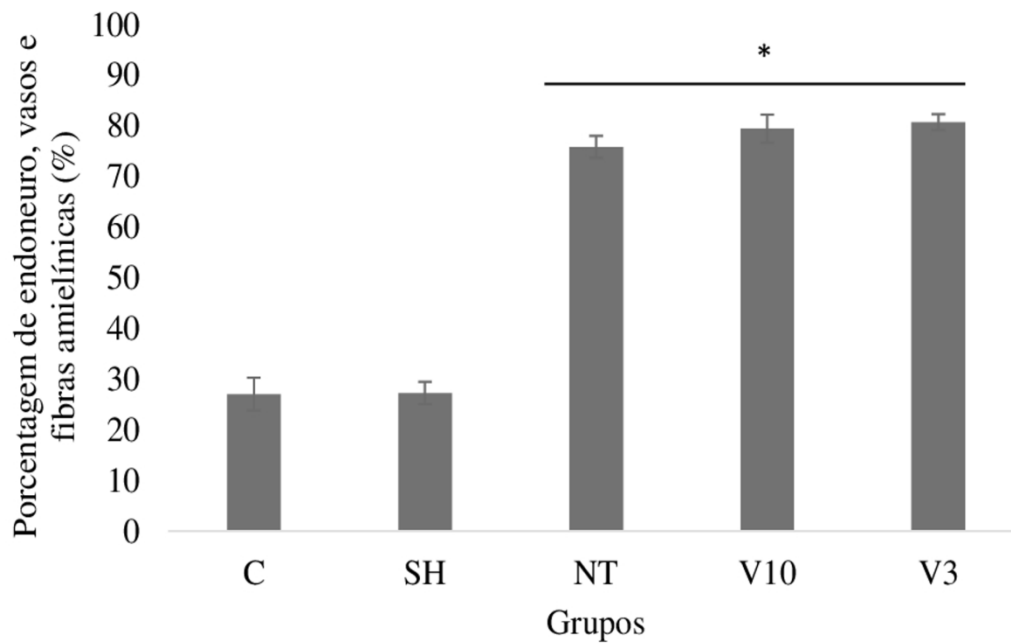


Figura 9: Gráfico apresentando o parâmetro morfométrico de porcentagem de área ocupada por fibras mielinizadas (A) e porcentagem de área ocupada por endoneuro, vasos sanguíneos e fibras amielínicas (B) do nervo isquiático para os grupos do estudo: controle (C), *sham*(SH), lesionado não treinado (NT), lesionado treinado com vibração iniciada 3 dias após a lesão (V3) e lesionado treinado com vibração iniciada 10 dias após a lesão (V10). \*  $P < 0,05$  vs C e SH. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Em relação aos grupos não lesionados, os grupos NT, V3 e V10 tiveram menor área média das fibras mielinizadas, menor área média dos axônios das fibras mielinizadas, menor diâmetro médio das fibras mielinizadas, menor diâmetro dos axônios das fibras mielinizadas, menor espessura da bainha de mielina e maior grau de mielinização, porém, sem diferença entre eles ( $P < 0,05$ ; Fig. 10).

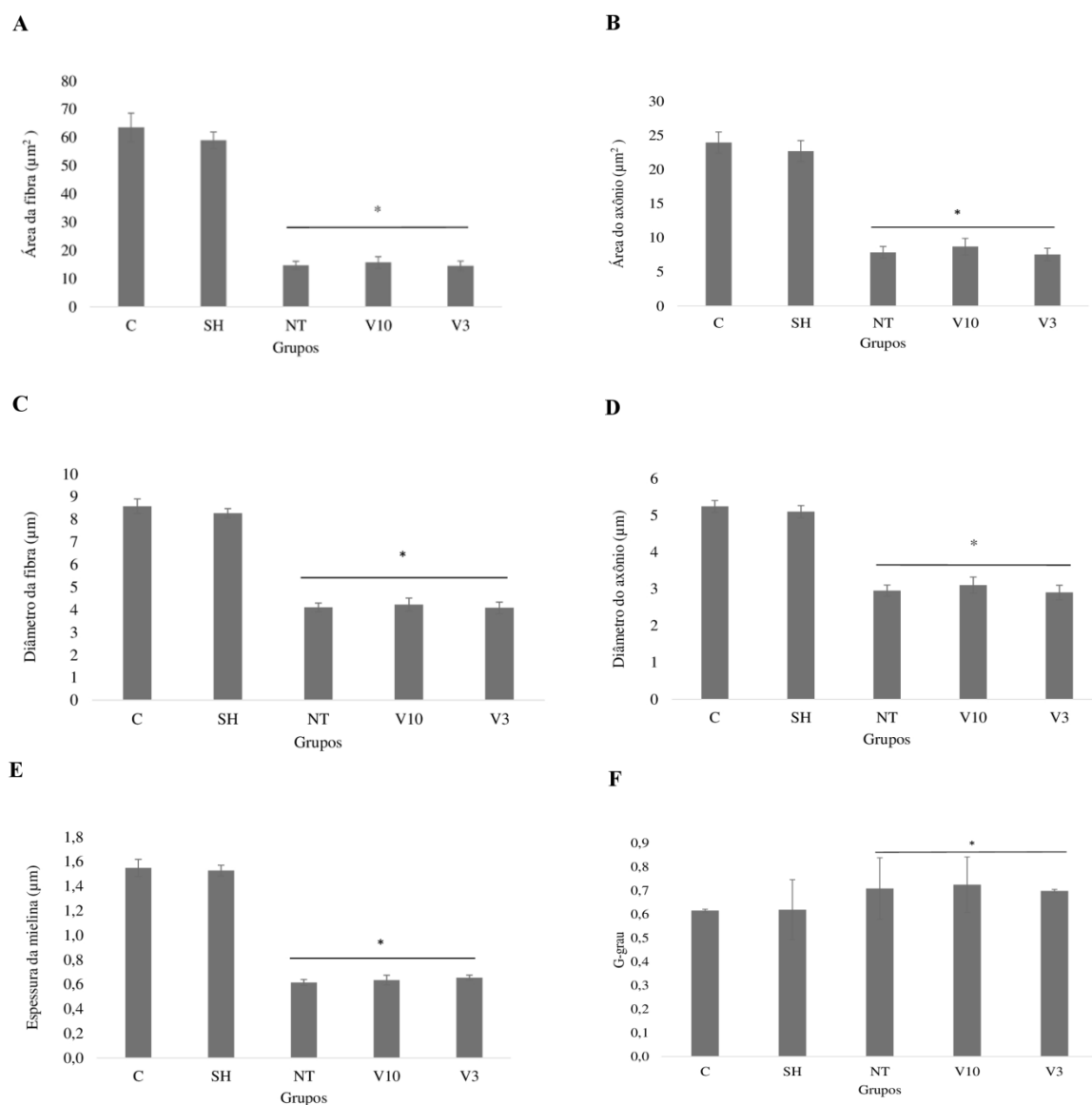


Figura 10: Gráficos apresentando os parâmetros morfométricos da área média das fibras mielinizadas (A), área média dos axônios das fibras mielinizadas (B), diâmetro médio das fibras mielinizadas (C), diâmetro médio dos axônios das fibras mielinizadas (D), espessura média da bainha de mielina (E) e grau de mielinização médio (F) do nervo isquiático para os grupos do estudo: controle (C), grupo *sham* (SH), grupo lesionado não treinado (NT), grupo lesionado treinado com vibração iniciada 3 dias após a lesão (V3) e grupo lesionado treinado com vibração iniciada 10 dias após a lesão (V10). \*  $P < 0,05$  vs C e SH. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média



## 6 DISCUSSÃO

Este estudo tratou-se de uma análise dos efeitos da vibração de corpo inteiro sobre a morfofuncionalidade do nervo isquiático após lesão por esmagamento deste nervo, em um modelo experimental. Para isso, avaliamos a funcionalidade do nervo isquiático, através dos testes: Índice funcional do isquiático (IFI), Escada horizontal (EH) e Barra estreita (BE); a histologia e morfometria do nervo nos grupos de animais não lesionados (C e SH); lesionados não treinados (NT) e lesionados que iniciaram o treinamento 3 dias (grupo V3) ou 10 dias (V10) após a lesão.

Em uma lesão por esmagamento do nervo isquiático os músculos extensores do membro posterior estão denervados (BAIN et al., 1989). Desse modo, os animais tendem a posicionar o membro posterior lesionado inteiramente durante a passada e algumas vezes, podem arrastar os dedos do membro lesionado, tornando, assim, mais negativos, os valores iniciais registrados do IFI. Entretanto, ao contrário de lesões mais graves como transecções nervosas e mesmo com habilidades anormais prevalentes por alguns meses, esses animais tendem a obter uma recuperação 16 a 25 dias após a lesão, atingindo valores próximos de -21 no IFI. Essa recuperação é simultânea entre todas as variáveis que são analisadas no índice: comprimento da pegada, abertura do primeiro ao quinto dedo e abertura do segundo e quarto dedos (MEDINACELI, FREED; WYATT, 1982).

A análise dos resultados do IFI mostrou que não existiram diferenças entre os animais do grupo controle (C) e do grupo *sham* (SH), indicando a efetividade do procedimento cirúrgico assim como a não sensibilidade do teste a fatores relacionados a lesão tecidual da pele e anexos. De acordo com a classificação proposta por Medinacelli (1995), comparativamente, os animais dos grupos lesionados (NT, V3 e V10) apresentaram, inicialmente (9 dias após a lesão), características de déficit completo (valores dentro da faixa de -88 a -112), atingindo, gradualmente, uma função boa (valores dentro da faixa de -13 a -37) a partir de 23 dias após a lesão. Ao final do estudo, porém, esses animais apresentaram característica de uma recuperação funcional parcial, uma vez que seus valores no IFI ainda permaneciam significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) dos animais não lesionados.

Estudos que também objetivaram analisar a recuperação funcional, ao longo do tempo, de ratos Wistar adultos submetidos à lesão por esmagamento, mostraram resultados variáveis sobre o dia da recuperação total dos animais: 49 dias (DIJKSTRA

et al.,2000) e 21 dias (GANGULY et al., 2017) após a lesão. Por outro lado, estudos que utilizaram protocolos de treino de aeróbico de moderado a intenso nesses animais (ILHA et al., 2007) e treino em esteira de baixa intensidade (10m/min) (BOBINSKI et al.,2011) observaram que os animais lesionados sem treinamento tiveram recuperação total da função pelo IFI, 35 dias e 28 dias após a lesão. Estes dados mostram que os ritmos de recuperação funcional poder ser variáveis após uma lesão por esmagamento.

Os resultados do IFI deste estudo, também, mostraram que os grupos lesionados tiveram comportamentos diferentes entre si, principalmente 13, 16 e 33 dias após a lesão. Neste período, apenas os grupos que iniciaram a vibração 10 dias após a lesão (grupo V10) tiveram valores no IFI significativamente mais negativos em relação ao grupo NT, evidenciando que a vibração pode ter causado prejuízos funcionais destes animais durante este período da lesão. Isto se torna mais evidente ao verificar-se o comportamento do grupo V10 logo após o início do treinamento deste grupo, no 13º dia após a lesão, com IFI mais negativo que os grupos NT e V3.

Além do IFI, os testes da Escada horizontal e da Barra estreita também foram utilizados, por permitirem análises funcionais mais específicas como do controle motor, desempenho e habilidades motoras. Dentre as estruturas periféricas relacionadas à execução dessas funções estão os proprioceptores, receptores envolvidos nas sensações conscientes como sentidos de posição, sentidos de movimento do membro (cinestesia), sentidos de força e tensão muscular, sentidos de equilíbrio, entre outros (PROSKE; GANDEVIA, 2012).

No teste da Escada horizontal, os grupos NT, V3 e V10 apresentaram recuperação progressiva ao longo do tempo, porém, ao final do estudo, eles apresentaram maior número de erros no posicionamento do membro posterior lesionado, em relação aos grupos C e SH. Além disso, assim como no IFI, no período de 16 dias após a lesão, o grupo V10, apresentou maior número de erros que o grupo NT, também, evidenciando, uma pior recuperação durante este período. Ao final do protocolo experimental, no 36º dia p.o, não existirem diferenças significativas entre os grupos lesionados.

No teste da Barra estreita, os três grupos de animais lesionados também apresentaram recuperação ao longo do tempo, e assim como nos outros testes funcionais, os grupos NT e V3 não apresentaram diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre si, porém em relação aos grupos C e SH, eles atingiram recuperação funcional completa. Neste teste, apenas o grupo V10 não atingiu a recuperação completa.

Adicionalmente, assim como nos outros testes, os grupos de animais que receberam vibração também apresentaram retardo na recuperação quando comparados com o grupo de animais não treinados.

Até o presente momento não foram encontrados dados disponíveis, na literatura, sobre a vibração na lesão nervosa periférica. Desse modo, os resultados deste estudo serão comparados com estudos sobre o exercício físico neste tipo de lesão e com estudos experimentais com a vibração, a fim de se propor mecanismos pelos quais a vibração pode ter atrasado a recuperação destes animais.

No estudo de Bonetti et al. (2011) foi avaliado o desempenho de ratos Wistar jovens adultos com lesão por esmagamento nos testes da Escada horizontal e da Barra estreita. Os autores observaram que 28 dias após a lesão, os ratos não atingiam a recuperação total nos dois testes. Na pesquisa de Cunha et al. (2011), ratos Wistar jovens adultos, ao final de 35 dias após a lesão por esmagamento do nervo isquiático não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle no teste da barra estreita. Por outro lado, no teste da escada horizontal, esses animais não atingiram a a recuperação total. Estes dados mostram que existem ritmos variáveis de recuperação nestes dois testes que podem ser justificados pelas diferentes variáveis motoras que estes testes avaliam.

O teste da barra estreita é um método mais sensível para monitorar déficits discretos no posicionamento do membro e no equilíbrio do corpo, enquanto o teste da escada horizontal é mais apropriado para avaliar a coordenação sensório-motora dos membros e as vias descendentes do controle motor, tornando assim, o primeiro teste mais sensível a detecção dos déficits funcionais do membro lesionado (SEDÝ et al., 2008).

Além disso, o procedimento metodológico de aplicação do teste da escada horizontal que permite a alteração da distância entre os degraus da escada para se criar um padrão irregular, exigindo que os animais adaptem suas passadas conforme a complexidade da disposição dos degraus (METZ; WHISHAW, 2002; FARR et al., 2006) poderiam justificar um maior desafio a execução deste teste para estes animais e, provavelmente, um maior tempo para atingirem a recuperação total.

Nas análises histológicas e morfométricas da porção distal do nervo isquiático, observou-se que os animais não lesionados apresentaram tecido nervoso constituído por algumas fibras amielínicas, por células de Schwann e fibras mielínicas distribuídas uniformemente e envoltas pelo endoneuro, portanto, características histológicas de uma

arquitetura tecidual normal e esperada de um nervo periférico como relatadas por Kerns (2008) e Topp e Boyd (2012). Ao contrário, nos animais lesionados, o nervo apresentou uma configuração tecidual com características de regeneração nervosa incompleta com fibras mielínicas menores e de menor calibre circundadas por um espesso endoneuro e presença de degeneração tecidual e grânulos de mielina em desintegração.

Morfometricamente, associados com os outros parâmetros analisados, em relação ao grupo controle, os animais lesionados apresentaram maior porcentagem de fibras amielínicas, endoneuro e vasos sanguíneos; menor porcentagem de fibras mielinizadas, menores áreas médias e diâmetros médios das fibras mielinizadas e de seus axônios e menor espessura média da mielina.

A histologia e morfometria dos grupos lesionados (NT, V3 e V10) representam eventos de degeneração walleriana; e que se tornam visíveis dentro de poucas horas após a lesão (GAUDET, POPOVICH; RAMER, 2011; WOOD et al., 2011;). Embora a fase de regeneração comece a se tornar evidente no período de 7 dias a 35 dias de lesão, a remielinização é detectada primeiramente no local da lesão em 21 dias, com ainda características degenerativas na porção distal ao final de 35 dias após a lesão (STA et al, 2014).

Axônios de área e diâmetro menores estão associados com a privação das conexões de suas porções terminais durante a regeneração, com o aumento do tecido conjuntivo, retração do endoneuro e aos efeitos tardios da lesão no corpo neuronal (FRAHER; DOCKERY, 1998). Quanto menores os diâmetros dos axônios e das fibras mielinizadas, maior é o grau de mielinização (g), obtido pela razão entre esses diâmetros. Ele é uma representação indireta da velocidade de condução nervosa. Seu parâmetro é utilizado como medida funcional e estrutural da mielinização axonal e, seu valor varia de 0 a 1, onde 0,6 é considerado o valor ideal (DIAS et al., 2015).

Neste estudo, os grupos C e SH tiveram grau médio de mielinização 0,6. Por outro lado, os grupos NT, V3 e V10 tiveram, em relação aos grupos C e SH, significativamente ( $P < 0,05$ ) maior grau médio de mielinização, com valores entre 0,7 e 0,8, sugerindo que seus axônios apresentavam menor velocidade de condução nervosa.

Estudos que compararam os efeitos do exercício na regeneração nervosa, após esmagamento do nervo isquiático, com animais sem treinamento observaram resultados semelhantes de regeneração nervosa nos animais lesionados e sem treinamento em relação ao grupo controle como maior porcentagem de tecido conjuntivo, maior número de axônios, menor diâmetro dos axônios e menor diâmetro das fibras mielinizadas,

menor espessura da mielina e maior grau de mielinização (ILHA et al., 2007; TEODORI et al., 2011, SOBRAL et al., 2008 e BONETTI et al., 2015, respectivamente). Entretanto, diferentes foram os efeitos do exercício sobre esses parâmetros.

Ilha et al. (2007), por exemplo, ao estabelecer protocolos diferentes de exercícios por 5 semanas, iniciados 14 dias após a lesão, observou que os animais que receberam o treino aeróbico (9 m/min por 60 min diários) de moderado a intenso tiveram maior espessura da mielina, menor quantidade de tecido conjuntivo e menor taxa de mielinização que os animais lesionados sem treinamento e os lesionados que receberam treinamento de resistência e treinamento aeróbico combinado com treino de resistência.

Bonetti et al.(2015), observaram que assim como o treino aeróbico e de moderado a intenso, um protocolo de exercício de equilíbrio e coordenação, iniciados 2 dias após a lesão, tinham melhorado as propriedades histológicas e morfométricas do nervo isquiático após a lesão como uma menor densidade e maior diâmetro médio de fibras mielinizadas.

Os resultados do presente estudo demonstram que morfologicamente a vibração não exerce efeitos sobre a regeneração do nervo isquiático após a lesão por esmagamento ao final dos 37 dias após a lesão, porém, funcionalmente, promove prejuízos na recuperação funcional quando iniciada 10 dias após a lesão.

O comprometimento funcional não depende apenas da gravidade da lesão, mas também, de fatores indiretos associados ao processo de reinervação como ramificação descontrolada de axônios em crescimento e erros na reinervação do órgão-alvo (VALLS-SOLE et al.,2011). O processo de reinervação dos músculos dos membros posteriores torna-se predominante no período de 14 dias após a lesão e o exercício, quando iniciado antes deste período, pode ser prejudicial (HERBINSON et al., 1973). Assim, danos musculares, por exemplo, poderiam ocorrer durante o curso da reinervação quando o número de unidades contráteis ainda é muito pequeno e a intensidade do exercício é muito grande (HERBINSON et al., 1974).

Entretanto, não existe consenso na literatura sobre qual período após a lesão nervosa periférica seria mais adequado para o início da aplicação do exercício físico. Van Meeterenetal (1997) mostraram que conforme o tipo de exercício e sua intensidade, o exercício iniciado nos primeiros dias após a lesão poderia ser benéfico para a recuperação sensório-motora do animal. Teodori et al. (2011) e Sobral et al. (2008)

compararam os efeitos da natação e do exercício em esteira (8m/min por 30 min diários), respectivamente, sobre diferentes fases da lesão: 1 dia e 14 dias após a lesão de esmagamento do nervo isquiático e verificaram que não havia diferença entre os animais lesionados exercitados, porém, em relação aos animais lesionados não exercitados, o exercício iniciado 1 dia ou 14 dias após lesão acelerou a regeneração nervosa e a recuperação funcional motora no estudo de Teodori et al. (2011) e em Sobral et al. (2008) não teve efeitos.

Cai; Na e Hwangbo (2015) compararam os efeitos de diferentes intensidades: baixa (8m/min), média (15m/min) e alta (20 m/min) de treino de 30 min em esteira, iniciado no primeiro dia ou 10 dias após a lesão por esmagamento do nervo isquiático e verificaram que a recuperação funcional foi melhor quando o exercício de baixa intensidade foi aplicado logo após a lesão e o exercício de alta intensidade, aplicado 10 dias após a lesão. Entretanto, não foi encontrado atraso na recuperação em nenhum dos períodos de aplicação do exercício e em nenhuma das diferentes intensidades exercício. Estes dados sugerem que o tipo de treinamento e os parâmetros aplicados são mais determinantes sobre a recuperação funcional que apenas o período de início do treino, após a lesão. Desse modo, é possível que os estímulos da vibração tenham influenciado os parâmetros funcionais através de seus efeitos sobre o controle sensorio-motor.

Estudos com indivíduos saudáveis têm observado que a vibração diminui a sensibilidade dos mecanorreceptores de Meissner e Paccini em até 3 horas após um protocolo agudo de 10 min de vibração a 41 Hz e 2 mm (SONZA et al., 2013). Desse modo, a alteração da percepção dos estímulos sensoriais e mecânicos pela vibração associado à importância destes *feedback* sensoriais para o controle sensorio motor e equilíbrio poderiam também ter influenciado o desempenho funcional dos animais submetidos à vibração. Ao analisar o equilíbrio de indivíduos submetidos a 15 min de vibração a 1 mm em frequências de 31 Hz, 35 Hz, 40 Hz e 44 Hz, por exemplo, observaram-se diminuição do controle postural apenas nas frequências de 40 Hz e 44 Hz (SONZA et al., 2015), sugerindo portanto, que estes efeitos dependem não apenas da vibração em si mas também dos parâmetros em que é aplicada.

Estudos experimentais têm associado os mecanismos de respostas neuromusculares da vibração, com parâmetros eletrofisiológicos e bioquímicos que envolvem as conexões entre aferências Ia e motoneurônios- $\alpha$ . Mettlach et al (2014), por exemplo, observou que as repostas eletrofisiológicas do músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a 4 semanas de vibração de corpo inteiro de 30 Hz, 0,3g durante 20 minutos

eram alteradas. Eles encontraram maior número de contrações e maior limiar de responsividade a frequências maiores do que do músculo dos animais que não receberam vibração, indicando aumento da força e da resistência a fadiga, respectivamente. Além disso, apesar da vibração não ter influenciado os potenciais evocados da placa motora, ela aumentou a liberação de *quantum* de neurotransmissores na junção neuromuscular.

Baczyk et al (2013), observaram os efeitos de 5 semanas de vibração de 50Hz, 2,5mm, 4,79g aplicada em 4 séries de 30 s, intercaladas por 60 s de descanso, em ratos e encontraram aumento na excitabilidade apenas dos motoneurônios rápidos. Eles associaram esses resultados à cinemática do treinamento da vibração, que exigiria maior função dos músculos do membro posterior a fim de compensar os deslocamentos do corpo durante a vibração. Associados a isto, teria-se uma maior participação de estruturas relacionadas ao equilíbrio, como o cerebelo, o qual estabelece maior número de conexões com motoneurônios rápidos.

Estudo com protocolo semelhante, avaliou os efeitos da vibração em longo prazo (3 meses e 6 meses) e observaram respostas distintas como maior ativação das fibras musculares de contração lenta e alteração da composição protéica das fibras musculares resistente a fadiga (aumento da cadeia pesada de miosina tipo IIa e diminuição do tipo I), no protocolo de 3 meses de vibração. Sugerindo assim, uma alteração dos mecanismos de controle da força, potenciação e fadiga muscular pela vibração. Por outro lado, no protocolo de 6 meses, as fibras musculares tornaram-se menos responsivas, sugerindo-se que existe um limite temporal entre a facilitação das respostas neurais e musculares a vibração (LOCHYNSKI et al., 2013).

Depois da lesão nervosa, as sinapses estabelecidas entre as aferências Ia e seus motoneurônios apresentam fases distintas. Nos primeiros 3 dias após a lesão, tem-se um aumento nas respostas pós-sinápticas, em seguida, um decréscimo e por fim um restabelecimento da sinapse, conforme o processo de reinervação se estabelece. Essas fases têm importantes efeitos sobre o controle motor e o processamento sensorial (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007), influenciado assim as respostas comportamentais de testes funcionais como os avaliados neste estudo.

O aumento da excitabilidade neuronal e sináptica, associado à diminuição da eficácia dos sistemas inibitórios descendentes e a remodelação das projeções aferentes sensoriais na medula espinal podem dificultar a recuperação da sinapse entre as

aferências Ia e os motoneurônios espinais (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007).

Neste estudo, os parâmetros de vibração utilizados (cinco *trials* de 3 min, 15 Hz e 30 Hz; 2 mm) foram estabelecidos por estarem de acordo com os valores comumente utilizados nos treinamentos físicos com vibração (CARDINALE; BOSCO, 2003). Além destas frequências se aproximarem dos valores fisiológicos de disparo dos motoneurônios espinais, os animais adaptam-se facilmente a elas (WIRTH et al., 2013) e juntamente com o valor da amplitude utilizado, constituem um treino de baixa intensidade (MARTÍNEZ-PARDO; ROMERO-ARENAS; ALCARAZ, 2013).

Apesar disto, não podemos desconsiderar que os animais são mais sensíveis à vibração que os humanos (RABEY et al., 2014) e apesar das frequências utilizadas serem consideradas fisiológicas, os neurônios motores -  $\alpha$  da região lombar de ratos, por exemplo, exibem ressonância nas frequências de 7 a 30 Hz (MANUEL et al., 2009) e podem, portanto, ser mais responsivos e não funcionais neste tipo de lesão e nestas frequências.

Não foram encontrados estudos que associam este tipo de treinamento com a lesão nervosa periférica por esmagamento e, muitos dos estudos experimentais sobre vibração variam em seus protocolos de aplicação, assim como, não existe uma padronização clara dos parâmetros descritos nos métodos utilizados.

Um dos estudos mais próximos dos parâmetros aplicados ao do presente estudo utilizou a vibração no modelo de lesão medular em ratos, onde se verificou que este tipo de treinamento apresenta diferentes respostas neuronais. Quando iniciada 14 dias após a lesão medular, a vibração de corpo inteiro restaura as conexões sinápticas dos neurônios motores alfa na medula espinal. Entretanto, quando iniciada 28 dias após a lesão medular, ela diminui a expressão de sinaptofisina nesses neurônios, indicando maiores efeitos prejudiciais sobre as conexões sinápticas da medula quando iniciada neste período (MANTHOU et al., 2017). Esse estudo mostrou que conforme o tempo de lesão, a vibração pode alterar as repostas motoras neuronais.

Juntos, portanto, essas alterações temporais do aumento da excitabilidade das aferências Ia e das respostas das unidades motoras com a vibração podem ter desempenhado funções importantes na lesão nervosa periférica. Isso porque, após a lesão nervosa periférica, as fibras Ia do fuso muscular estão entre as que menos recuperam sua arborização sináptica (ARBAT-PLANA et al., 2015).



Desse modo, considerando que o papel da vibração sobre o aumento da excitabilidade dessas aferências assim como sobre os mecanismos de modulação espinal e supraespinal e sobre suas sinapses, sugere-se que a vibração neste modelo de lesão nervosa, possa ter alterado as respostas destas aferências quando aplicada a partir de 10 dias após a lesão. Sugerimos, assim, que a excitabilidade das conexões sinápticas espinais pela vibração possa ter sido prejudicial quando aplicadas a partir de 10 dias, onde as respostas eletrofisiológicas e sinápticas estavam começando a se restabelecer. Adicionalmente a estas respostas, os mecanismos de lesão que caracterizam o 10º dia p.o podem justificar o porquê do treinamento com vibração ter tido resultados funcionais diferentes nos grupos de animais treinados.

Nos três primeiros dias de lesão, há um rápido processo de degeneração axonal (STA et al., 2014), com aumento da permeabilidade vascular e a ativação de mecanismos pró-inflamatórios. Esses eventos contribuem para as características cardinais da inflamação: edema, calor e rubor e dor. No terceiro dia após a lesão, inicia-se a maior fase de reparação do nervo e envolve o recrutamento de células inflamatórias, principalmente macrófagos para o endoneuro (ZOCHODNE, 2000) da região proximal da lesão. Novos axônios amielinizados e de pequeno diâmetro já podem ser encontrados nesta região (STA et al., 2014).

Na região distal da lesão, o aumento da permeabilidade vascular, juntamente com a infiltração dessas células é observado nos 7 a 14 dias após a lesão (WICAKSONO; GHUFRON; SUSILOWATI, 2016). Neste período, essas células liberam uma variedade de moléculas importantes ao meio regenerativo como fatores de crescimento (IGF-1, VEGF, PDGF) e interleucinas, que estimulam a produção de NGF nas células de Schwann (ZOCHODNE, 2000). Aos 14 dias após a lesão a presença dos macrófagos é reduzida, uma vez que, a barreira entre o endotélio e o nervo já se encontra restaurada. Aos 21 dias, a permeabilidade vascular é restaurada (WICAKSONO; GHUFRON; SUSILOWATI, 2016) e a remielinização dos axônios, mesmo que pequena, já é observada (STA et al., 2014).

Considerando-se que alterações nesses eventos podem retardar a regeneração (ZOCHODNE, 2000), e que os tecidos do corpo respondem de maneira específica às oscilações a que são submetidos, é possível que a vibração tenha influenciado o ambiente de crescimento axonal, agindo, por exemplo, sobre a microcirculação local, a produção e secreção de substâncias pró-inflamatórias/ anti-inflamatórias e de fatores de crescimento.

Durante o treinamento com vibração, ocorrem alterações vasculares como aumento do fluxo sanguíneo, do metabolismo tecidual (GAMES; SEFTON, 2011) e da superfície corporal do corpo, podendo se estender por minutos após o treinamento (JOHNSON et al., 2014). Entretanto, estes efeitos parecem depender dos parâmetros a que a vibração é aplicada. Em estudo de Sonza et al., (2013), encontraram, por exemplo, diminuição da temperatura do membro inferior de indivíduos saudáveis, 15 minutos após a vibração, apenas quando submetidos a 44 Hz e 31 Hz e sem alteração nas frequências de 40 Hz e 35 Hz.

Em parâmetros inflamatórios, os efeitos da vibração têm sido controversos como ausências de respostas inflamatórias teciduais (THEODOROU et al., 2015) e, aumento de substâncias anti-inflamatórias, por exemplo, IL-10 e diminuição da expressão de substâncias pró-inflamatórias, por exemplo, TNF- $\alpha$  em indivíduos saudáveis (RODRIGUEZ-MIGUELEZ et al., 2015) e com osteoartrite (SIMÃO et al. 2012)

Kim et al. (2014), observaram que a vibração (45 Hz, 0,4g por 10 min) aplicada durante três dias consecutivos, em um modelo experimental de lesão óssea, reverteu os mecanismos inflamatórios, inibindo a expressão de TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IGF-1. Weinheimer-Hauset al. (2014), utilizando ratos diabéticos como modelo de cicatrização prolongada, induziram ferimento no dorso do animal. Eles observaram que cinco dias semanais de vibração (45 Hz, 0,4g por 30 min) aumentou a angiogênese, e a super-expressão de IGF-1 e VEGF, porém sem diferenças entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. No 15º dia da ferida, o número de macrófagos aumentou o que foi associado ao processo de reparo tecidual.

Entretanto, parece que esses efeitos dependem também do tempo após a lesão em que é iniciada a vibração. Analisando os efeitos de 12 semanas de vibração de corpo inteiro (cinco séries de 15 Hz e 30 Hz, 1,5 mm por 15 min) iniciada em fases diferentes no modelo experimental de lesão medular, Wirth et al. (2013), Schwarz et al. (2015) e Manthou et al. (2017) encontraram melhora da função locomotora teste (Escala Basso, Beattie and Bresnahan) apenas nos animais que iniciaram a vibração 14 dias após a lesão. Embora não foram encontradas diferenças no volume da lesão, a vibração iniciada 1 dia após a lesão medular pareceu prejudicar a recuperação funcional (WIRTH et al., 2013). Além disso, a vibração iniciada 28 dias após a lesão aumentou a reposta inflamatória local (MANTHOU et al., 2017).

Com relação à produção de fatores de crescimento, a vibração parece aumentar a produção dessas substâncias. Zhao et al., (2014), por exemplo, observaram aumento do

número de neurônios dopaminérgicos e aumento de BDNF em modelo experimental de Parkinson, onde os animais foram submetidos a quatro semanas de vibração (10 Hz e 30Hz ; 5mm por 15 min), sugerindo um efeito neuroprotetor da vibração. Ao contrário, Kartha et al., (2014) ao analisarem os efeitos da vibração (15 Hz, 1,5mm por 30 min) durante 7 dias, sobre os discos intervertebrais da coluna cervical, atribuíram o aumento nos níveis de BDNF e NGF, a hiperinervação da região discal, portanto, aumentando a sensibilidade na região.

Estudos também mostram que a vibração pode promover alterações nervosas periféricas como, por exemplo, redução do transporte axonal retrógrado de neurônio motores ventrais e aumento do transporte axonal retrógrado nos neurônios sensoriais do nervo isquiático de ratos vibrados a 60 Hz, 30 min durante 10 dias (PAVEL et al., 2011). De acordo com Wauch et al., (2016) evidências têm mostrado que a vibração pode induzir alterações nos mecanismos celulares, desregulando o ciclo celular através da produção de estresse oxidativo na pele, artéria e nervo. Além disso, existem relatos de fraqueza dos membros posteriores e dificuldade na marcha de animais submetidos a 5 horas de vibração diária (YAN et al., 2005). Também foram registrados efeitos lesivos na morfologia neuronal e vascular em modelos experimentais de exposição prolongada à vibração durante atividades ocupacionais, como desmielinização, edema e fibrose do perineuro no nervo isquiático e espessamento da camada endotelial (MATLOUB et al., 2005; LUNDBORG et al.,1987).

Dessa forma, como visto acima, diferentes estudos evidenciam que vibração de corpo inteiro pode alterar a permeabilidade vascular, o processo inflamatório, o reparo tecidual, a produção de fatores de crescimento e a excitabilidade neuromuscular. Estes aspectos podem justificar os efeitos desta forma de treinamento sobre processos de degeneração e regeneração nervosa, reinervação muscular e controle motor, abordados no presente estudo.

Por fim, é importante considerar que existe uma crescente divulgação comercial envolvendo o treinamento físico através da vibração de corpo inteiro em clínicas e academias. Entretanto, existe pouco respaldo científico sobre os efeitos deste tipo de treinamento em diferentes protocolos. Desta forma, os resultados deste estudo, demonstram que este tipo de treinamento deve ser usado com mais cautela e embasamento científico.

## **7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em conclusão, ratos submetidos à lesão do nervo isquiático por esmagamento apresentaram, após um período de 37 dias, parâmetros histomorfométricos e funcionais indicativos de regeneração nervosa incompleta. O treinamento físico por vibração do corpo inteiro, neste modelo experimental, não alterou os parâmetros histomorfométricos do nervo isquiático, mas, quando iniciado 10 dias após a lesão nervosa, promoveu prejuízos na recuperação funcional.

Desse modo, a fim de elucidar os efeitos da vibração de corpo inteiro sobre a regeneração nervosa periférica, sugere-se a realização de novos estudos que incluam análise longitudinal da histomorfometria do nervo isquiático ao longo do protocolo de treinamento, a quantificação da produção de substâncias pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e de fatores de crescimento e a análise de parâmetros eletrofisiológicos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLODI, I.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. **Progress in neurobiology**, v. 98, n. 1, p.16-37, 2012.

ARBAT-PLANA, A.; TORRES-ESPÍN, A.; NAVARRO, X.; UDINA, E. Activity dependent therapies modulate the spinal changes that motoneurons suffer after a peripheral nerve injury. **Experimental neurology**, v. 263, p.293-305, 2015.

BACZYK, M.; HALUSZKA, A.; MRÓWCZYSKI, W.; CELICHOWSKI, J.; KRUTKI, P. The influence of a 5-wk whole body vibration on electrophysiological properties of rat hindlimb spinal motoneurons. **Journal of neurophysiology**, v. 109, n. 11, p.2705-2711, 2013.

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 83, n. 1, p. 129-38, 1989.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008

BENNET, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n.1, p.87-107, 1988.

BOBINSKI, F.; MARTINS, D.F.; BRATTI, T.; MAZZARDO-MARTINS, L.; WINKELMANN-DUARTE, E.C.; GUGLIELMO, L.G.; SANTOS, A.R.; Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p.337-348, 2011.

BONETTI, L.V.; KORB, A.; SILVA, S.A.da.; ILHA, J.; MARCUZZO, S.; ACHAVAL, M.; FACCIANI-HEUSER, M.C. Balance and coordination training after sciatic nerve injury. **Muscle & nerve**, v. 44, n. 1, p.55-62, 2011.

BONETTI, L.V.; SCHNEIDER, A.P.; BARBOSA, S.; ILHA, J.; FACCIANI-HEUSER, M.C. Balance and coordination training and endurance training after nerve injury. **Muscle & nerve**, v. 51, n. 1, p.83-91, 2015.

BONETTI, L.V.; MALYSZ, T.; ILHA, J.; BARBOSA, S.; ACHAVAL, M.; FACCIANI-HEUSER, M.C. The effects of two different exercise programs on the ultrastructural features of the sciatic nerve and soleus muscle after sciatic crush. **The anatomical record: advances in integrative anatomy and evolutionary biology**, v.30, 2017.

BRAMLETT, H.M.; DIETRICH, W.D.; MARCILLO, A.; MAWHINNEY, L.J.; FURONES-ALONSO, O.; BREGY, A.; PENG, Y.; WU, Y.; PAN, J.; WANG, J.; GUO, X.E.; BAUMAN, W.A.; CARDOZO, C.; QIN, W. Effects of low intensity vibration on bone and muscle in rats with spinal cord injury. **Osteoporosis international**, v. 25, n. 9, p.2209-2219, 2014.

BRIDGE, P. Nerve crush injuries- a model for axonotmesis. **Experimental neurology**, v. 127, n. 2, p.284-290, 1994.

CAI, J.; NA, S.; HWANGBO, G. The effects of exercise intensity and initial timing on functional recovery after sciatic nerve crush injury in rats. **Journal of the Korean Society of Physical Medicine**, v. 10, n. 3, p. 219–225, 2015.

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

CARDINALE, M.; BOSCO, C. The use of vibration as an exercise intervention. **Exercise and sport sciences reviews**, v.31, n.1, p.3-7, 2003

CARDINALE, M; RITTWEGGER, J. Vibration exercise makes your muscles and bones stronger: fact or fiction?. **The journal of the British Menopause Society**, v. 12, n. 1, p.12-18, 2006.

CHANOU, K.; GERODIMOS, V.; KARATRANTOU, K.; JAMURTAS, A. Whole-body vibration and rehabilitation of chronic diseases: a review of the literature. **Journal of sports science & medicine**, v.1, n.2, p: 187-200, 2012.

COCHRANE, D.J. Vibration exercise: the potential benefits. **International journal of sports medicine**, v. 32, n. 02, p.75-99, 2011.

CUNHA, N.B.; ILHA, J.; CENTENARO, L.A.; LOVATEL, G.A.; BALBINOT, G.A.; ACHAVAL, M. The effects of treadmill training on young and mature rats after traumatic peripheral nerve lesion. **Neuroscience letters**, v. 501, n. 1, p. 15–19, 2011.

DIAS, F.J.; ISSA, J.P.; COUTINHO-NETTO, J.; FAZAN, V.P.; SOUSA, L.G.; LYOMASA, M.M.; PAPA, P.C.; WATANABE, I.S. Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy and latex protein (Heveabrasiliensis) administration following a crush injury of the sciatic nerve in rats. **Journal of the neurological sciences**, v. 349, n. 1-2, p.129-137, 2015.

DIJKSTRA, J.R.; MEEK, M.F.; ROBINSON, P.H.; GRAMSBERGEN, A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. **Journal of neuroscience methods**, v. 96, n. 2, p. 89–96, 2000.

DUCHATEAU, J.; ENOKA, R. Neural adaptations with activity patterns in able-bodied humans. **American journal of physical medicine & rehabilitation**, v.81.p.17-27, 2002.

ENGLISH, A.W.; WILHELM, J.C.; WARD, P.J. Exercise, neurotrophins, and axon regeneration in the PNS. **Physiology**, v. 29, n. 6, p.437-445, 2014.

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

FARR, T.D.; LIU, L.; COLWELL, K.L.; WHISHAW, I.Q.; METZ, G.A. Bilateral alteration in stepping pattern after unilateral motor cortex injury: a new test strategy for

analysis of skilled limb movements in neurological mouse models. **Journal of neuroscience methods**, v. 153, n. 1, p. 104–113, 2006.

FLORES, A.J.; LAVERNIA, C.J.; OWENS, P.W. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. **The American journal of orthopedics**, v.29,n.3,p.167-73, 2000.

FRAHER, J.; DOCKERY, P. A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. **Journal of anatomy**, v. 193, n. 2, p.195–201, 1998.

FU, S.Y.; GORDON, T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. **Molecular neurobiology**, v. 14, n. 1-2, p.67-116, 1997.

GALEA, M.P. Physical modalities in the treatment of neurological dysfunction. **Clinical neurology and neurosurgery**, v. 114, n. 5, p.483-488, 2012.

GAGLIARDO, A.; TOIA, F.; MAGGI, F.; MARIOLO, A.V.; CILLINO, M.; MOSCHELLA, F. Clinical neurophysiology and imaging of nerve injuries: preoperative diagnostic work-up and postoperative monitoring. **Plastic and aesthetic research**, v. 2, n. 4, p. 149-155, 2015.

GAMES, K.E.; SEFTON, J.M. Whole-body vibration influences lower extremity circulatory and neurological function. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 23, n. 4, p.516-523, 2011.

GANGULY, A.; MCEWEN, C.; TROY, E.L.; COLBURN, R.W.; CAGGIANO, A.O.; SCHALLERT, T.J.; PARRY, T.J. Recovery of sensorimotor function following sciatic nerve injury across multiple rat strains. **Journal of neuroscience methods**, v. 275, p.25-32, 2017.

GAUDET, A.D; POPOVICH, P.G; RAMER, M.S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p.110-122, 2011.

GEUNA, S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. **Journal of neuroscience methods**, v. 243, p. 39-46, 2015.

GEUNA, S.; RAIMONDO, S.; FREGNAN, F.; HAASTERT-TALINI, K.; GROTHE, C. *In vitro* models for peripheral nerve regeneration. **European journal of neuroscience**, v. 43, p.287-296, 2016.

GREENE, E.C.; **Anatomy of the rat**. 27. v. New York: American philosophical society, 1955.

GRINSELL, D.; KEATING, C. P. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. **Biomed research international**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

GORIO, A.; CARMIGNOTO, G.; FINESSO, M.; POLATO, P.; NUNZI, M.G. Muscle reinnervation-II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 403-16, 1983.

HADJ-SAÏD, W.; BANGRATZ, M.; VIGNAUD, A.; CHATONNET, A.; BUTLER-BROWNE, G.; NICOLE, S.; AGBULUT, O.; FERRY, A. Effect of locomotor training on muscle performance in the context of nerve-muscle communication dysfunction. **Muscle & nerve**, v. 45, n. 4, p. 567-577, 2012.

HE, Z; JIN, Y. Intrinsic control of axon regeneration. **Neuron**, v. 90, n. 3, p.437-451, 2016.

HERBISON, G.J; JAWEED, M.M; DITUNNO, J.F. Reinnervating muscle in rats: the effect of overwork. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 54.n. 11.p. 511-4, 1973.

HERBISON, G.J; JAWEED, M.M; DITUNNO, J.F. Effects of swimming on reinnervation of rat skeletal muscle.**Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry**, vol. 37, p. 1247– 1251, 1974.

HERRERO, A.J.; MENÉNDEZ, H.; GIL, L.; MARTÍN, J.; GARCÍA-LÓPEZ, D.; GIL-AGUDO, A.; MARÍN, P.J. Effects of whole-body vibration on blood flow and neuromuscular activity in spinal cord injury. **Spinal cord**, v. 49, n. 4, p.554-559, 2010.

HONG, J; BARNES, M; KESSLER, N. Case study: use of vibration therapy in the treatment of diabetic peripheral small fiber neuropathy. **Journal of bodywork and movement therapies**, v. 17, n. 2, p.235-238, 2013.

HOUSCHYAR, K.S.; MOMENI, A.; PYLES, M.N.; CHA, J.Y.; MAAN, Z.N.; DUSCHER, D.; JEW, O.S.; SIEMERS, F.; VAN SCHOONHOVEN, J. The role of current techniques and concepts in peripheral nerve repair. **Plastic surgery international [electronic resource]**,v. 2016, p. 1-8, 2016

ILHA, J.; ARAUJO, R.T.; MALYSZ, T.; HERMEL, E.E.; RIGON, P.; XAVIER, L.L.; ACHAVAL, M. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabilitation and neural repair**,v. 22, n. 4, p. 355-366, 2007.

JOHNSON, P.K.; FELAND, J.B.; JOHNSON, A.W.; MACK, G.W.; MITCHELL, U.H. Effect of whole body vibration on skin blood flow and nitric oxide production. **Journal of diabetes science and technology**, v. 8, n. 4, p. 889-894, 2014.

KARTHA, S.; ZEEMAN, M.E.; BAIG, H.A.; GUARINO, B.B.; WINKELSTEIN, B.B. Upregulation of BDNF and NGF in cervical intervertebral discs exposed to painful whole-body vibration. **Spine**,v. 39, n. 19, p. 1542-1548, 2014.

KESSLER, N.J.; HONG, J. Whole body vibration therapy for painful diabetic peripheral neuropathy: a pilot study. **Journal of bodywork and movement therapies**,v. 17, n. 4, p. 518-522, 2013.



KERNS, J.M. The microstructure of peripheral nerves. **Techniques in regional anesthesia and pain management**, v. 12, n. 3, p. 127-133, 2008.

KORB, A.; BONETTI, L.V.; DA SILVA, S.A.; MARCUZZO, S.; ILHA, J.; BERTAGNOLLI, M.; PARTATA, W.A.; FACCIANI-HEUSER, M.C. Effect of treadmill exercise on serotonin immunoreactivity in medullary raphe nuclei and spinal cord following sciatic nerve transection in rats. **Neurochemical research**, v. 35, n. 3, p. 380-389, 2009.

KRAJNAK, K.; RILEY, D.A.; WU, J.; MCDOWELL, T.; WELCOME, D.E.; XU, X.S.; DONG, R.G. Frequency-dependent effects of vibration on physiological systems: experiments with animals and other human surrogates. **Industrial health**, v. 50, p. 343-353, 2012.

LIAO, C.F.; YANG, T.Y.; CHEN, Y.H.; YAO, C.H.; WAY, T.D.; CHEN, Y.S. Effects of swimming exercise on nerve regeneration in a rat sciatic nerve transection model. **Biomedicine**, v. 7, n.1, p. 3-9, 2017.

LIU, K.; TEDESCHI, A.; PARK, K.K.; HE, Z. Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration. **Annual review of neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 131-152, 2011.

LOCHYNSKI, D.; KACZMAREK, D.; REDOWICZ, M.J.; CELICHOWSKI, J.; KRUTKI, P. Long-term effects of whole-body vibration on motor unit contractile function and myosin heavy chain composition in the rat medial gastrocnemius. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v.13, n. 4, p. 430-441, 2013.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; HANSSON, H.A.; NECKING, L.E.; PYYKKO, I. Intraneural edema following exposure to vibration. **Scandinavian journal of work, environment & health**, v. 13, n.4, p. 326–9, 1987.

LUONG, T.N.; CARLISLE, H.J.; SOUTHWELL, A.; PATTERSON, P.H. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. **Journal of visualized experiments**, v.49, p.2376, 2011.

KIM, I.S.; LEE, B.; YOO, S.J.; HWANG, S.J. Whole body vibration reduces inflammatory bone loss in a lipopolysaccharide murine model. **Journal of dental research**, v. 93, n. 7, p. 704-710, 2014.

MACKINNON, S.E.; DELLON, A.L.; HUDSON, A.R.; HUNTER, D.A. Chronic nerve compression – an experimental model in the rat. **Annals of plastic surgery**, v. 13, n. 2, p. 112-20, 1984.

MALYSZ, T.; ILHA, J.; NASCIMENTO, P.S.; DE ANGELIS, K.; SCHAAN, B.D.; ACHAVAL, M. Beneficial effects of treadmill training in experimental diabetic nerve regeneration. **Clinics**, v. 65, n. 12, p.1329-1337, 2010.

MANTHOU, M.; ABDULLA, D.S.; PAVLOV, S.P.; JANSEN, R.; BENDELLA, H.; NOHROUDI, K.; STEIN, G.; MEYER, C.; OZSOY, O.; OZSOY, U.; BEHRAM KANDEMIR, Y.; SARIKCIOGLU, L.; SEMLER, O.; SCHOENAU, E.; DUNLOP, S.; ANGELOV, D.N. Whole body vibration (WBV) following spinal cord injury (SCI) in

rats: timing of intervention. **Restorative neurology and neuroscience**, v. 35, n. 2, p. 185-216, 2017.

MANUEL, M.; IGLESIAS, C.; DONNET, M.; LEROY, F.; HECKMAN, C.J.; ZYTNICKI, D. Fast kinetics, high-frequency oscillations, and subprimary firing range in adult mouse spinal motoneurons. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n.36, p. 11246–11256, 2009.

MARTÍNEZ-PARDO, E.; ROMERO-ARENAS, S.; ALCARAZ, P.E. Effects of different amplitudes (high vs. low) of whole-body vibration training in active adults. **Journal of strength and conditioning research**, v. 27, n. 7, p. 1798-1806, 2013.

MATLOUB, H.S.; YAN, J.G.; KOLACHALAM, R.B.; ZHANG, L.L.; SANGER, J.R.; RILEY, D.A. Neuropathological changes in vibration injury: an experimental study. **Microsurgery**, v. 25, n. 1, p. 71-75, 2005.

MEDINACELI, L; FREED, W.J.; WYATT, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental neurology**, v. 77, n. 3, p. 634-643, 1982.

MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **Journal of neuroscience methods**, v. 58, n. 1-2, p. 29-37, 1995.

MENORCA, R.M.; FUSSELL, T.S.; ELFAR, J.C. Nerve physiology. **Hand clinics**, v. 29, n. 3, p. 317-330, 2013.

METTLACH, G.; POLO-PARADA, L.; PECA, L.; RUBIN, C.T.; PLATTNER, F.; BIBB, J.A. Enhancement of neuromuscular dynamics and strength behavior using extremely low magnitude mechanical signals in mice. **Journal of biomechanics**, v. 47, n. 1, p. 162-167, 2014.

METZ, G.A.; MERKLER, D.; DIETZ, V.; SCHWAB, M.E.; FOUAD, K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. **Brain research**, v. 883, n. 2, p. 165-177, 2000.

METZ, G.A.; WHISHAW, I.Q. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. **Journal of neuroscience methods**, v. 115, n. 2, p. 169-179, 2002.

MIETTO, B.S.; MOSTACADA, K.; MARTINEZ, A.M. Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

MONTE-RASO, V.V; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N.; YAMASITA, A.C.; BARBIERI, G. Is the sciatic functional index always reliable and reproducible?. **Journal of neuroscience methods**, v.170, n. 2, p. 225-261, 2008.

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

NAZAROV, V.; SPIVAK, G. Development of athlete's strength abilities by means of biomechanical stimulation method. **Theory and practice of physical culture**, v. 12, p. 445-450, 1985.

PAVEL, J.; HRICOVÁ, L.; JERGOVÁ, S.; LUKACOVA, N. The impact of short-lasting repeated vibrations on retrograde axonal transport, the expression of cgrp and parvalbumin in lower lumbar dorsal root ganglia. **Brain research**, v. 1396, p. 1-10, 2011.

PODHAJSKY, R.J.; MYERS, R.R. The vascular response to nerve crush: relationship to wallerian degeneration and regeneration. **Brain research**, v. 623, n. 1, p. 117-123, 1993.

POZO-CRUZ, B.del.; ADSUAR, J.C.; PARRACA, J.A.; POZO-CRUZ, J.DEL.; OLIVARES, P.R.; GUSI, N. Using whole-body vibration training in patients affected with common neurological diseases: a systematic literature review. **The journal of alternative and complementary medicine: research on paradigm, practice, and policy**, v. 18, n. 1, p. 29-41, 2012.

PROSKE, U.; GANDEVIA, S.C. The proprioceptive senses: their roles in signaling body shape, body position and movement, and muscle force. **Physiological reviews**, v. 92, n. 4, p. 165-97, 2012.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WHITE, L.E. **Neurociências**, 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

RABEY, K.N.; LI, Y.; NORTON, J.N.; REYNOLDS, R.P.; SCHMITT, D. Vibrating frequency thresholds in mice and rats: implications for the effects of vibrations on animal health. **Annals of biomedical engineering**, v. 43, n. 8, p. 1957-1964, 2014.

RITTWEGER, J. Vibration as an exercise modality: how it may work, and what its potential might be. **European journal of applied physiology**, v. 108, n. 5, p. 877-904, 2009.

ROBINSON, L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle & nerve**, v. 23, n. 6, p. 863-873, 2000.

RODRIGUEZ-MIGUELEZ, P.; FERNANDEZ-GONZALO, R.; COLLADO, P.S.; ALMAR, M.; MARTINEZ-FLOREZ, S.; PAZ, J.A.de.; GONZÁLEZ-GALLEGU, J.; CUEVAS, M.J. Whole-body vibration improves the anti-inflammatory status in elderly subjects through toll-like receptor 2 and 4 signaling pathways. **Mechanisms of ageing and development**, v. 150, p. 12-9, 2015.

SARIKCIOGLU, L.; DEMIREL, B.M.; UTUK, A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. **Folia morphologica**, v. 68, n. 1, p. 1-7, 2009.

SAVASTANO, L.E.; LAURITO, S.R.; FITT, M.R.; RASMUSSEN, J.A.; GONZALEZ POLO, V.; PATTERSON, S.I. Sciatic nerve injury: a simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. **Journal of neuroscience methods**, v. 227, p. 166-180, 2014.

SCHWARZ, A.; PICK, C.; HARRACH, R.; BENDELLA, H.; OZSOY, O.; OZSOY, U.; SCHOENAU, E.; JAMINET, P.; SARIKCIOGLU, L.; DUNLOP, S.; ANGELOV, D.N. Reactions of the rat musculoskeletal system to compressive spinal cord injury (sci) and whole body vibration (wbv) therapy. **Journal of musculoskeletal neuronal interactions**, v. 15, n. 2, p. 123-13, 2015.

SEDDON, H.J. Three types of nerve injury. **Brain**, v. 66, n. 4, p. 237-288, 1943.

SEDÝ, J.; URDZÍKOVÁ, L.; JENDELOVÁ, P.; SYKOVÁ, E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 32, n. 3, p. 550-580, 2008.

SIMÃO, A.P.; AVELAR, N.C.; TOSSIGE-GOMES, R.; NEVES, C.D.; MENDONÇA, V.A.; MIRANDA, A.S.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L.; ANDRADE, A.P.; COIMBRA, C.C.; LACERDA, A.C. Functional performance and inflammatory cytokines after squat exercises and whole-body vibration in elderly individuals with knee osteoarthritis. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 93, n. 10, p. 1692-700, 2012.

SJOBERG, J.; KANJE, M. The initial period of peripheral nerve regeneration and importance of the local environment for the conditioning lesion effect. **Brain research**, v. 529, p. 79-84, 1990.

SOBRAL, L.L.; OLIVEIRA, L.S.; TAKEDA, S.Y.M.; SOMAZZ, M.C.; MONTEBELO, M.I.L.; TEODORI, R.M. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axonotmese: análise histomorfométrica e funcional axonotmese: histomorphometric and functional analysis. **Revista brasileira de fisioterapia**, v. 12, n. 4, p. 311-6, 2008.

SON, Y.J.; TRACHTENBERG, J.T.; THOMPSON, W.J. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. **Trends in neurosciences**, v. 19, n. 7, p. 280-285, 1996.

SONZA, A.; MAURER, C.; ACHAVAL, M.; ZARO, M.A.; NIGG, B.M. Human cutaneous sensors on the sole of the foot: altered sensitivity and recovery time after whole body vibration. **Neuroscience letter**, v. 533, p. 81-85, 2013.

SONZA, A.; VOLKEL, N.; ZARO, M.A.; ACHAVAL, M.; HENNIG, E.M. A whole body vibration perception map and associated acceleration loads at the lower leg, hip and head. **Medial engineering & physics**, v. 37, n. 7, p. 642-649, 2015.

STA, M.; CAPPAERT, N.L.; RAMEKERS, D.; BAAS, F.; WADMAN, W.J. The functional and morphological characteristics of sciatic nerve degeneration and regeneration after crush injury in rats. **Journal of neuroscience methods**, v. 222, p. 189-198, 2014.

SULAIMAN, W.; GORDON, T. Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. **The ochsner journal**, v. 13, n. 1, p. 100–108, 2013.

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

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

SVENNIGSEN, Å; DAHLIN, L. Repair of the peripheral nerve-remyelination that works. **Brain sciences**, v. 3, n. 3, p. 1182-1197, 2013.

TEODORI, R.M.; BETINI, J.; OLIVEIRA, L.S.de.; SOBRAL, L.L.; TAKEDA, S.Y.M.; MONTEBELO, M.I.L.de. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. **Neural plasticity**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

THEODOROU, A.A.; GERODIMOS, V.; KARATRANTOU, K.; PASCHALIS, V.; CHANOU, K.; JAMURTAS, A.Z.; NIKOLAIDIS, M.G. Acute and chronic whole-body vibration exercise does not induce health-promoting effects on the blood profile. **Journal of human kinetics**, v. 27, n. 46, p. 107-118, 2015.

TONGE, D.A.; GOLDING, J.P. Regeneration and repair of peripheral nervous system. **Seminars in neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 385-390, 1993.

TOPP, K.S.; BOYD, B.S. Peripheral nerve: from the microscopic functional unit of the axon to the biomechanically loaded macroscopic structure. **Journal of hand therapy**, v. 25, n. 2, p. 142–152, 2012.

TOS, P.; RONCHI, G.; PAPALIA, I.; SALLEN, V.; LEGAGNEUX, J.; GEUNA, S.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G. Chapter 4: methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I—experimental models. **International review of neurobiology**, v. 87, p. 47-79, 2009.

UDINA, E.; COBIANCHI, S.; ALLODI, I.; NAVARRO, X. Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. **Annals of anatomy=Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 193, n. 4, p. 347-353, 2011.

UDINA, E; PUIGDEMASA, A; NAVARRO, X. Passive and active exercise improve regeneration and muscle reinnervation after peripheral nerve injury in the rat. **Muscle & nerve**, v. 43, n. 4, p. 500-509, 2011.

VALLS-SOLE, J.; CASTILLO, C.D.; CASANOVA-MOLLA, J.; COSTA, J. Clinical consequences of reinnervation disorders after focal peripheral nerve lesions. **Clinical neurophysiology**, v. 122, n. 2, p. 219-228, 2011.

VAREJÃO, A.S.P.; MEEK, M.F.; FERREIRA, A.J.A.; PATRICIO, J.A.B.; CABRITA, A.M.S. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. **Journal of neuroscience methods**, v. 108, p. 1-9, 2001.

VAREJÃO, A.S.; CABRITA, A.M.; MEEK, M.F.; BULAS-CRUZ, J.; MELO-PINTO, P.; RAIMONDO, S.; GEUNA, S.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. **Journal of neurotrauma**, v. 21, n. 11, p. 1652-1670, 2004.

VAN-MEETEREN, N.L.; BRAKKEE, J.H.; HAMERS, F.P.; HELDERS, P.J.; GISPEN, W.H. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in rat. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 28, n.1, p. 70-77, 1997.

WAUGH, S.; KASHON, M.L.; LI, S.; MILLER, G.R.; JOHNSON, C.; KRAJNAK, K. Transcriptional pathways altered in response to vibration in a model of hand-arm vibration syndrome. **Journal of occupational and environmental medicine**, v. 58, n. 4, p. 344-350, 2016.

WEINHEIMER-HAUS, E.M.; JUDEX, S.; ENNIS, W.J.; KOH, T.J. Low-intensity vibration improves angiogenesis and wound healing in diabetic mice. **PloS one**, v. 11, n. 3, 2014.

WICAKSONO, S.; GHUFRON, M.; SUSILOWATI, R. The percentage of macrophage numbers in rat model of sciatic nerve crush injury. **Journal of medical sciences**, v. 47, n. 1, p. 1-11, 2016.

WIRTH, F.; SCHEMPF, G.; STEIN, G.; WELLMANN, K.; MANTHOU, M.; SCHOLL, C.; SIDORENKO, M.; SEMLER, O.; EISEL, L.; HARRACH, R.; ANGELOVA, S.; JAMINET, P.; ANKERNE, J.; ASHRAFI, M.; OZSOY, O.; OZSOY, U.; SCHUBERT, H.; ABDULLA, D.; DUNLOP, S.A.; ANGELOV, D.N.; IRINTCHEV, A.; SCHÖNAU, E. Whole-body vibration improves functional recovery in spinal cord injured rats. **Journal of neurotrauma**, v. 30, n. 6, p. 453-68, 2013.  
WOOD, M.D.; KEMP, S.W.; WEBER, C.; BORSCHER, G.H.; GORDON, T. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. **Annals of anatomy**, v. 193, n. 4, p. 321–333, 2011.

WUNDERER, K.; SCHABRUN, S.M.; CHIPCHASE, L.S. The effect of whole body vibration in common neurological conditions – a systematic review. **Physical therapy reviews**, v. 13, n. 6, p. 434-442, 2008.

WYNN, T.A.; VANNELLA, K.M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450-462, 2016.

YANG, K.J.; YAN, Y.; ZHANG, L.L.; AGRESTI, M.A.; MATLOUB, H.S.; LOGIUDICE, J.A.; HAVLIK, R.; YAN, J.G. Increasing calcium level limits Schwann cell numbers in vitro following peripheral nerve injury. **Journal of reconstructive microsurgery open**, v. 2017, p. 1-6, 2017.

YOUAKIM, S. The validity of Raynaud's phenomenon symptoms in HAVS cases. **Occupational medicine**, v. 58, n. 6, p. 431-435, 2008.

YUE, Z.; MESTER, J. A model analysis of internal loads, energetics, and effects of wobbling mass during the whole-body vibration. **Journal of biomechanics**, v. 35, n. 5, p. 639-647, 2002.

ZHAO, L.; HE, L.X.; HUANG, S.N.; GONG, L.J.; LI, L.; LV, Y.Y.; QIAN, Z.M. Protection of dopamine neurons by vibration training and up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in a MPTP mouse model of parkinson's disease. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 63, n. 5, p. 649-657, 2014.

ZOCHODNE, D.W. **Neurobiology of peripheral nerve regeneration**. New York: United States of America by Cambridge University Press, 2008.

ZOCHODNE, D.W. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. **Muscle & nerve**, v. 23, n. 9, p. 33-38, 2000.

