



Artigo Original

Expressão de neurotrofinas e avaliação histomorfométrica em ratos Wistar submetidos à mobilização neural após compressão do nervo mediano[☆]



Marieli Araujo Rossoni Marcioli^a, José Luis da Conceição Silva^b,
Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro^c, Rose Meire Costa Brancalhão^c
e Gladson Ricardo Flor Bertolini^{c,*}

^a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Cascavel, PR, Brasil

^b Programa de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Cascavel, PR, Brasil

^c Programa de Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Cascavel, PR, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 16 de janeiro de 2017

Aceito em 16 de março de 2017

On-line em 29 de maio de 2017

Palavras-chave:

Regeneração nervosa

Histologia

Peptídeos e proteínas de sinalização intercelular

Exercício

Nervo mediano

R E S U M O

Objetivo: Avaliar a expressão de RNAm de neurotrofinas e a contagem de axônios no nervo mediano de ratos Wistar submetidos à mobilização neural (MN) após compressão nervosa. **Métodos:** Foram divididos aleatoriamente 18 animais em G1 (apenas compressão nervosa), G2 (MN por 1 minuto) e G3 (MN por 3 minutos). Para a MN, os animais foram anestesiados e o membro escapular direito recebeu a mobilização, adaptada da forma indicada para humanos, em dias alternados, do terceiro ao 13º dia de pós-operatório (PO), em seis dias de terapia. No 14º dia PO, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Fragmentos do nervo mediano, distais ao procedimento de compressão, foram retirados para análise histomorfométrica e de expressão das neurotrofinas, fator de crescimento do nervo (NGF) e fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF) por RT-PCR.

Resultados: A análise histomorfométrica evidenciou diferenças no número de axônios nos lados lesionados, que foi significativamente menor no nervo do membro lesado comparado com o membro controle; por sua vez, a análise por RT-PCR não apontou diferenças significativas na expressão de NGF e nem de BDNF.

Conclusão: O tratamento de MN não afetou a regeneração do nervo mediano, que manteve índices normais de recuperação.

© 2017 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

[☆] Trabalho desenvolvido na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Cascavel, PR, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: gladsonricardo@gmail.com (G.R. Bertolini).

<https://doi.org/10.1016/j.rbo.2017.03.019>

0102-3616/© 2017 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Neurotrophin expression and histomorphometric evaluation in Wistar rats subjected to neural mobilization after compression of the median nerve

A B S T R A C T

Keywords:

Nerve regeneration
Histology
Intercellular signaling peptides and proteins
Exercise
Median nerve

Objective: To evaluate the neurotrophin mRNA expression and axon count in the median nerve of Wistar rats submitted to neural mobilization (NM) after nerve compression.

Methods: Eighteen animals were randomly divided into G1 (nerve compression only), G2 (NM for 1 minute), and G3 (NM for 3 minutes). For NM, the animals were anesthetized and the right scapula received the mobilization, adapted as indicated for humans, on alternate days, from the third to the 13th postoperative (PO) day, totaling six days of therapy. On the 14th PO day, animals were anesthetized and euthanized. Fragments of the median nerve, distal to the compression procedure, were removed for histomorphometric analysis and expression of neurotrophins, nerve growth factor (NGF), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) by RT-PCR.

Results: Histomorphometric analysis revealed differences in the number of axons in the injured side, which was significantly lower in the injured limb nerve compared to the control limb, whereas the RT-PCR analysis showed no significant differences in the expression of NGF or BDNF.

Conclusion: NM treatment did not affect median nerve regeneration, which maintained normal recovery rates.

© 2017 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A síndrome do túnel do carpo (STC) é a compressão nervosa periférica mais comum, de alta incidência, é mais prevalente em mulheres e idosos. Apresenta-se como uma compressão do nervo mediano quando esse passa sob o ligamento carpal transverso¹ que inicialmente causa um bloqueio do fluxo venoso seguido por reação inflamatória, fibrose, desmielinização e perda axonal. Além disso, há aumento na expressão de prostaglandina E2, fator de crescimento do endotélio vascular e interleucina 6. Sinais e sintomas clínicos da STC são caracterizados por dormência e parestesias nos primeiros três dedos e lado radial do quarto dedo, despertar noturno devido à dor, além de fraqueza e atrofia muscular.²

A cirurgia eletiva de descompressão do túnel do carpo é feita em casos graves e refratários, o tratamento conservador é usado em casos leves e moderados¹ e apresenta como vantagens o menor número de complicações e o custo reduzido. Os tratamentos não cirúrgicos incluem tala, anti-inflamatórios não hormonais, injeção local de corticosteroide, além de recursos fisioterapêuticos como o ultrassom, laser de baixa potência e exercícios.²

O Guideline Europeu para o tratamento da STC aponta que a abordagem deve ser multidisciplinar e que exercícios terapêuticos como a mobilização neural (MN) podem ser considerados como opção de tratamento.³ A técnica produz comprovadamente alterações na excursão do nervo periférico⁴ que podem prevenir ou reduzir edema intraneural e, dessa forma, reabilitar a função normal do nervo.⁵ Apesar de já ser muito usada entre os fisioterapeutas, a literatura ainda

não permite afirmar que ela tenha repercussão positiva no tratamento da STC.⁶

Em compressões nervosas graves ocorre a degeneração walleriana, que produz alterações morfológicas⁷ e subsequente produção de neurotrofinas.⁸ Os fatores neurotróficos (como o Fator de Crescimento do Nervo – NGF e o Fator de Crescimento Derivado do Cérebro – BDNF) regulam a sobrevivência, o desenvolvimento, a diferenciação e a regeneração neuronal. São liberados pelas células de Schwann, após lesões do tipo axonotmese, e a completa regeneração neuronal depende de sua expressão e de condições tróficas favoráveis à síntese proteica.⁹

Vistas algumas controvérsias a respeito da eficácia da MN diretamente sobre o nervo mediano, o presente estudo avaliou seus efeitos sobre o número de axônios e expressão de neurotrofinas (NGF e BDNF), em dois diferentes tempos de aplicação da técnica em ratos submetidos a um modelo de compressão nervosa.

Material e métodos

A presente pesquisa é de caráter experimental. O projeto foi conduzido segundo as normas internacionais de ética em experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (parecer n° 1012/12). Foram usados 18 ratos Wistar, machos, com 14 ± 2 semanas, mantidos em fotoperíodo de 12 h, 23 ± 1 °C, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram separados, aleatoriamente, em três grupos: G1 (n = 6) – submetido à compressão nervosa sem tratamento (foi apenas anestesiado); G2 (n = 6) – submetido à compressão nervosa

e tratado com mobilização neural por 1 minuto; G3 (n=6) – submetido à compressão nervosa e tratado com mobilização neural por 3 minutos.

Compressão do nervo mediano

Para fazer a compressão do nervo mediano foi usado o modelo apresentado por Chen *et al.*¹⁰ e se fez amarrar com fio Catgut 4.0 cromado em 4 pontos, com distância aproximada de 1 mm, no n. mediano, na região proximal ao cotovelo direito. Para fazer o procedimento cirúrgico de compressão nervosa, os animais foram previamente anestesiados com solução de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg).

Mobilização do nervo mediano

Para a feitura da MN (G2 e G3) os animais foram anestesiados e o tratamento procedido no membro escapular direito foi adaptado da forma indicada para tratamento em humanos. O animal foi posicionado em decúbito dorsal, com flexão lateral cervical à esquerda, depressão da cintura escapular e leve abdução, rotação externa e supinação, com a máxima extensão possível em cotovelo e punho até a sensação de resistência ao movimento. Nessa posição foram feitas oscilações repetidas de flexoextensão do punho por 1 minuto (G2) ou 3 minutos (G3). Foram feitas seis terapias, em dias alternados, entre o 3º ao 13º dias pós-operatório (PO).¹¹ Nos mesmos dias de tratamento de G2 e G3, os animais de G1 foram anestesiados e recolocados em suas caixas sem ser submetidos ao protocolo.

Avaliação histomorfométrica

No fim do período de tratamento, no 14º PO, com o animal anestesiado, foram dissecados e retirados dois fragmentos do nervo mediano, na região distal ao procedimento de compressão. Também foi retirado um fragmento do nervo do membro contralateral, para comparações com o lado lesionado, posteriormente os animais foram eutanasiados por decapitação. Os fragmentos foram fixados em formol 10% e processados para inclusão em parafina histológica. O material foi seccionado transversalmente, com espessura de 5 µm, e colorado com hematoxilina e eosina.

Com a objetiva de 100x, foram capturadas imagens de quatro campos visuais, nos quadrantes superiores esquerdo e direito e inferiores direito e esquerdo, de acordo com as recomendações de Geuna *et al.*¹² As imagens foram analisadas com o programa Image-Pro-Plus 6.0, no qual se fez a contagem do número de axônios em cada quadrante, numa área de 23.184 µm². Foram então subdivididos aqueles que se apresentavam com características de normalidade (com presença de bainha de mielina e axônio) daqueles que apresentaram características de degeneração.

Expressão das neurotrofinas NGF e BDNF

Os fragmentos nervosos distais, armazenados em -80 °C, foram homogeneizados para isolar o RNA total com o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total extraído foi dissolvido em água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato), quantificado em 260/280 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA) e submetido ao procedimento de transcrição reversa pela técnica de RT-PCR, segundo o esquema abaixo

Tabela 1 – Resultados da análise histomorfométrica do nervo mediano direito (D) e esquerdo (E), com relação à contagem do número de axônios

	Direito (lesão) ^a	Esquerdo (controle) ^a
<i>Normais</i>		
G1	47,21 ± 44,95	66,50 ± 50,92
G2	73,58 ± 57,05	129,8 ± 34,36
G3	40,96 ± 56,92	104,9 ± 15,11
<i>Degenerados</i>		
G1	8,00 ± 12,43	3,62 ± 8,88
G2	5,17 ± 11,36	0 ± 0
G3	31,96 ± 35,85	0 ± 0

^a Diferenças significativas observadas entre os lados.

demonstrado. A síntese de cDNA foi feita com a enzima Superscript II (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a síntese do cDNA foi feita a amplificação por PCR, as reações foram feitas com 2 µL de cDNA com os primers G3PDH (controle - T°C 53 °C), NGF (T°C 60 °C) e BDNF (T°C 53 °C). As temperaturas de anelamento entre parênteses foram específicas para os primers. Foram feitos 35 ciclos de PCR (94 °C, Temp. anelamento, 72 °C). G3PDH foi considerado como gene controle. Os seguintes pares de primers foram usados: BDNF: 5'AATCCCATGGGTTACACGAA3' e 5'AAGTTGTGCGCAAATGACTG3'; NGF: 5'ATCCACCCACCCAGTCTCCACAT3' e 5'GGCAGCCTGTTTGTCTGTTGT3'; GAPDH: 5'CCTCTGGAAAGCTGTGGCGT3' e 5'TTGAGGCCATGTTAGCCAT3

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados em transiluminador ultravioleta (UVP-USA).

Análise dos dados

Os resultados foram expressos e analisados por meio da estatística descritiva e inferencial, com o uso do programa Bioestat 5.0. Foi usado Anova fatorial, foram considerados como blocos os lados direito e esquerdo, o nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Com relação à contagem de axônios, observou-se que não houve diferença entre os tratamentos (F=2,97, p=0,06), mas sim entre os nervos lesionados e os contralaterais (F=9,31, p=0,004), sem interação (F=0,81, p=0,54). Para aqueles que se apresentavam em degeneração, o resultado foi semelhante, sem diferenças entre os grupos (F=2,13, p=0,13), com diferenças entre os lados (F=6,25, p=0,01), mas sem interação (F=2,68, p=0,08) (tabela 1).

Com relação à expressão gênica de NGF e BDNF, não houve diferença entre os grupos avaliados (fig. 1). Pôde-se observar a amplificação do gene G3PDH (controle), que demonstrou a expressão constitutiva deste gene, contudo os genes NGF e BDNF não foram expressos em quantidades detectáveis no experimento. Houve uma amplificação fraca do gene BDNF no grupo 1B (banda amplificada de 385 pb).

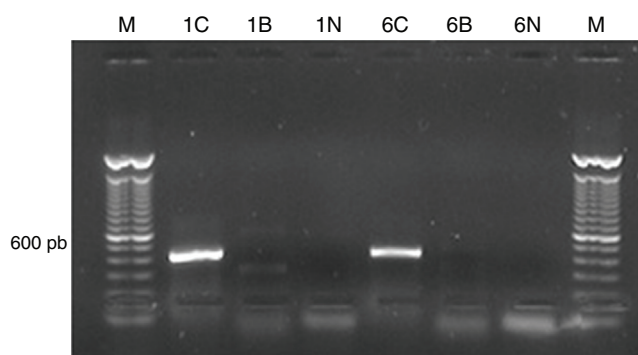


Figura 1 – Análise dos produtos amplificados por RT-PCR em eletroforese de gel de agarose 1%. M = DNA ladder 100 pb; 1 C e 6 C cDNA amplificado para o gene controle G3PDH (banda amplificada de 430 pb). 1 B e 6 B: cDNA amplificado com os primers BDNF e 1 N e 6 N: cDNA amplificado com os primers NGF.

Discussão

Apesar de a MN ser usada para ganho de flexibilidade,^{13,14} força muscular,¹⁵ redução de dor¹⁶⁻¹⁹ e acelerar o reparo tecidual,¹¹ existem controvérsias com relação à eficácia da técnica, nos estudos experimentais feitos em indivíduos com compressões nervosas, que podem ocorrer devido à diversidade de protocolos usados, com diferentes intensidades e posicionamentos.⁴ Como no presente estudo, que buscou adaptar no modelo animal o posicionamento de estiramento do nervo mediano feito na prática clínica com humanos.²⁰

São consideradas hipóteses, para benefícios da técnica, a facilitação do deslizamento nervoso, a redução de aderências, a dispersão de fluidos nocivos, o aumento da vascularização neural e a melhoria do fluxo axoplasmático. Contudo, esses mecanismos ainda requerem validação.²¹ Segundo Ginanneschi et al.,²² a tensão produzida é capaz de reduzir falhas na condução nervosa, deve-se ter cautela ao usar tais técnicas em pacientes com STC.

Foi observado que a mobilização neural, independentemente de se feita com os tempos de 1 e 3 minutos, não apresentou diferenças com relação ao grupo controle, manteve-se com valores menores de células com características normais e em maior quantidade de células em degeneração. Isso foi condizente com estudo prévio, no qual também não foram observadas melhorias com o uso da MN, nesse modelo experimental de lesão, em variáveis como diâmetro de fibras nervosas e de axônios, espessura de bainha de mielina, nem na razão mielina/axônio e quociente G, bem como não houve redução do quadro nociceptivo.¹¹ Mesmo tendo como base a ausência de melhoria em tais parâmetros, acreditava-se que o estímulo mecânico, aplicado na técnica de MN, poderia ter incitado o brotamento nervoso²³ e, assim, aumentado o número de fibras nervosas, bem como a produção de neurotrofinas locais, com vistas ao reparo do tecido nervoso.²⁴

Santos et al.²⁵ também usaram a compressão nervosa por amarraria, porém em nervo isquiático de ratos, e fizeram a mobilização neural 14 dias após o protocolo de lesão, em dias alternados durante 10 terapias, e observaram melhoria

funcional dos animais tratados, recuperação da força muscular do tibial anterior e aumento da quantidade de receptores opioide-kappa na substância cinzenta periaqueductal. Em outro trabalho, os autores²⁶ observaram que os animais tratados apresentaram menor nocicepção (tanto alodínea quanto hiperalgisia) e redução dos níveis de NGF no gânglio da raiz dorsal ipsilateral à lesão, essa foi uma possível razão para a redução do quadro álgico.

Contudo, outro estudo do mesmo grupo²⁷ apontou que a mobilização neural produziu algumas características de recuperação, como maior número de axônios com bainhas de mielina de espessura normal e menor aderência entre axônios, mas localmente houve aumento na concentração de NGF avaliada por *Wester blotting*. No presente estudo, também se buscou analisar a expressão de neurotrofinas no local da compressão, porém, diferentemente dos autores supracitados, não houve diferenças na expressão das mesmas com o uso da técnica de RT-PCR. Salienta-se que a mobilização neural foi usada de forma precoce, ou seja, nas primeiras duas semanas após a compressão por amarraria, foi possível retardar o início do tratamento e poderia mostrar-se benéfico, essa é outra limitação do estudo e indicada como tema de futuros estudos.

Conclusão

Com os protocolos usados, a MN não favoreceu a regeneração nervosa no modelo de compressão do nervo mediano de ratos Wistar, que manteve índices normais de recuperação.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Ao Centro de Reabilitação Física da Unioeste pelo financiamento parcial da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Gillig JD, White SD, Rachel JN. Acute carpal tunnel syndrome. *J Am Acad Orthop Surg*. 2008;16(3):276-82.
- Li Z-J, Wang Y, Zhang H-F, Ma X-L, Tian P, Huang Y. Effectiveness of low-level laser on carpal tunnel syndrome: A meta-analysis of previously reported randomized trials. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(31), e4424. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27495063>.
- Huisstede BM, Fridén J, Coert JH, Hoogvliet P. Carpal tunnel syndrome: Hand surgeons, hand therapists, and physical medicine and rehabilitation physicians agree on a multidisciplinary treatment guideline—results from the European HANDGUIDE study. *Arch Phys Med Rehabil*. 2014;95(12):2253-63.
- Coppieters MW, Andersen LS, Johansen R, Giskegjerde PK, Høivik M, Vestre S, et al. Excursion of the sciatic nerve during nerve mobilization exercises: an in vivo cross-sectional study using dynamic ultrasound imaging. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2015;45(10):1-23.

5. Efstathiou MA, Stefanakis M, Savva C, Giakas G. Effectiveness of neural mobilization in patients with spinal radiculopathy: a critical review. *J Bodyw Mov Ther.* 2015;19(2):205-12.
6. Silva AKC, Assis T, de O. Influência da mobilização neural na reabilitação da síndrome do túnel do carpo: uma revisão sistemática. *Rev Bras Ciênc Saúde.* 2011;9(28):43-7.
7. Mazzer PY, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VP. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. *J Neurosci Methods.* 2008;173(2):249-58.
8. Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Fernández-Garza NE. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17(5):314-24.
9. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J.* 1987;6(9), 2856.
10. Chen J, Lue J, Lin L, Huang C, Chiang RP, Chen C, et al. Effects of pre-emptive drug treatment on astrocyte activation in the cuneate nucleus following rat median nerve injury. *Pain.* 2010;148(1):158-66.
11. Marcioli MA, Coradini JG, Kunz RI, Ribeiro LD, Brancalhão RM, Bertolini GR. Nociceptive and histomorphometric evaluation of neural mobilization in experimental injury of the median nerve. *Sci World J.* 2013;2013:1-6.
12. Geuna S, Tos P, Guglielmono R, Battiston B, Giacobini-robecchi MG. Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. *Anat Embryol.* 2001;204(1):1-10.
13. Sharma S, Balthillaya G, Rao R, Mani R. Short term effectiveness of neural sliders and neural tensioners as an adjunct to static stretching of hamstrings on knee extension angle in healthy individuals: A randomized controlled trial. *Phys Ther Sport.* 2016;17:30-7.
14. Nunes MK, Santos GF, Silva DC, Freitas AC, Henriques IF, Andrade PM, et al. Acute effects of neural mobilization and infrared on the mechanics of the median nerve. *J Physcial Ther Sci.* 2016;28(6):1720-3.
15. Araujo BF, do Nascimento CM, Busarello FO, Moreira NB, Baroni MP, de Carvalho AR, et al. Assessment of handgrip strength after neural mobilization. *Rev Bras Med do Esporte.* 2012;18(4):242-5.
16. Beltran-Alacreu H, Jiménez-Sanz L, Fernández Carnero J, La Touche R. Comparison of hypoalgesic effects of neural stretching vs neural gliding: a randomized controlled trial. *J Manipulative Physiol Ther.* 2015;38(9):644-52.
17. Silva LI, Rocha BP, Antunes JS, Karvat J, Kakhata CMM, Mattjie TF, et al. Evaluation of the pressure pain threshold after neural mobilization in individuals with sciatica. *Eur J Physiother.* 2013;15:146-50.
18. Frutos AL, Araujo BF, Silva EAA, Bertolini GRF. Pain threshold assessment in relation to neural mobilization therapy. *Acta Sci Heal Sci.* 2012;34:303-8.
19. Kim MK, Cha HG, Ji SG. The initial effects of an upper extremity neural mobilization technique on muscle fatigue and pressure pain threshold of healthy adults: a randomized control trial. *J Phys Ther Sci.* 2016;28(3):743-6.
20. Oliveira Junior F, Teixeira AH. Mobilização do sistema nervoso: avaliação e tratamento. *Fisioter Mov.* 2007;20(3):41-53.
21. Ellis RF, Hing WA. Neural mobilization: a systematic review of randomized controlled trials with an analysis of therapeutic efficacy. *J Man Manip Ther.* 2008;16(1):8-22.
22. Ginanneschi F, Cioncoloni D, Bigliuzzi J, Bonifazi M, Lorè C, Rossi A. Sensory axons excitability changes in carpal tunnel syndrome after neural mobilization. *Neurol Sci.* 2015;36(9):1611-5.
23. Dahlin LB. The biology of nerve injury and repair. *J Am Soc Surg Hand.* 2004;4(3):143-55.
24. Boucher TJ, McMahon SB. Neurotrophic factors and neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1(1):66-72.
25. Santos FM, Grecco LH, Pereira MG, Oliveira ME, Rocha PA, Silva JT, et al. The neural mobilization technique modulates the expression of endogenous opioids in the periaqueductal gray and improves muscle strength and mobility in rats with neuropathic pain. *Behav Brain Funct.* 2014;10(19). [PMC4050394](https://doi.org/10.1186/PMC4050394).
26. Santos FM, Silva JT, Giardini AC, Rocha PA, Achermann AP, Alves AS, et al. Neural mobilization reverses behavioral and cellular changes that characterize neuropathic pain in rats. *Mol Pain.* 2012 Jul 29;57(8), <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-8-57>.
27. da Silva JT, Santos FM, Giardini AC, Martins DO, de Oliveira ME, Ciena AP, et al. Neural mobilization promotes nerve regeneration by nerve growth factor and myelin protein zero increased after sciatic nerve injury. *Growth Factors.* 2015;33(1):8-13.