



**UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO
CLARO**



CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIANA PASQUINI RODRIGUES

**NEUROMODULAÇÕES DO NERVO PERIFÉRICO APÓS
ALONGAMENTO ESTÁTICO ASSOCIADO A ESCADA VERTICAL:
NOVAS PERSPECTIVAS MORFOQUANTITATIVAS E
MOLECULARES**



**Rio Claro
2021**

MARIANA PASQUINI RODRIGUES

NEUROMODULAÇÕES DO NERVO PERIFÉRICO APÓS
ALONGAMENTO ESTÁTICO ASSOCIADO A ESCADA VERTICAL:
NOVAS PERSPECTIVAS MORFOQUANTITATIVAS E MOLECULARES

Orientador: Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2021

R696n Rodrigues, Mariana Pasquini
Neuromodulações do nervo periférico após alongamento estático
associado a escada vertical: novas perspectivas morfoquantitativas e
moleculares / Mariana Pasquini Rodrigues. -- Rio Claro, 2021
50 f. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Biociências, Rio Claro
Orientador: Adriano Polican Ciena

1. Morfologia. 2. Anatomia. 3. Exercícios físicos. 4. Nervo ciático.
5. Biologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu namorado Raphael, por ser minha estrutura, por me dar forças e pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis até aqui. Sem você eu não seria metade do que sou hoje.

Aos meus pais, Elaine e Walmir, por todo apoio e incentivo que me deram durante todo esse tempo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Polican Ciena por todo o apoio e orientação durante essa jornada e agradeço pela incrível oportunidade de poder trabalhar ao seu lado.

Agradeço também à toda equipe do Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LAMAF) por todos os momentos juntos e pelo apoio, ajuda e conselhos que me deram durante essa caminhada. Vocês arrasam!

Ao meu professor de Biologia do ensino fundamental, Thiago Dini, que despertou minha paixão pela área e me incentivou a seguir nessa linda aventura.

Por último, agradeço também ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Campus Rio Claro pela disponibilização do material, recursos e equipamentos necessários para este trabalho e pelo acolhimento durante todos esses anos.

O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa suficiente para nossa busca contínua.

Stephen Hawking

RESUMO

Durante a prática de exercício físico, adaptações podem ocorrer devido a sua execução, não só no tecido muscular, mas também em outras estruturas envolvidas, como por exemplo os nervos periféricos. Entretanto, as adaptações decorrentes nos nervos não são bem elucidadas, principalmente em exercícios utilizando o próprio peso corporal. O nervo isquiático tem grande importância em estudos envolvendo atividade física devido a sua função e localização, entretanto, as adaptações morfoquantitativas e análises moleculares frente ao protocolo de alongamento e escada vertical podem elucidar possíveis benefícios da prática combinada. O objetivo do presente estudo consistiu em analisar e descrever as adaptações morfoquantitativas e expressão proteica da proteína zero de mielina (P0), proteína básica de mielina (MBP) e neurofilamento (NF) no nervo isquiático mediante o protocolo de alongamento estático e treinamento calistênico em escada vertical. Foram utilizados 24 ratos *Wistar* adultos, divididos em 4 grupos distintos: Sedentário (S); Alongamento Estático (AE); Treinamento de escalada (TE); Alongado Pré-Treinamento de escalada (ATE). Foram utilizados 3 animais de cada grupo para as variáveis morfológicas, onde estas foram mensuradas em 130 fibras nervosas através do software ImageJ[®] obtidas através de microscopias de transmissão, enquanto que para a expressão dos componentes do nervo, foram usados 3 animais de cada grupo para a análise da expressão através da técnica de Western Blot. Foram realizados testes estatísticos através de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para as variáveis área da bainha de mielina, diâmetro do axônio, diâmetro da fibra nervosa, espessura da bainha de mielina e coeficiente G; ANOVA One-Way seguida de pós-teste de Bonferroni para a variável neurofilamentos por área; e ANOVA One-Way seguida do pós-teste de Tukey para a expressão de P0, MBP e NF. Os resultados foram obtidos através da obtenção de micrografias de transmissão e técnicas de eletroforese (ensaios de Western Blot), onde foi possível analisar medidas morfométricas, morfológicas, e a expressão das proteínas e NF. O grupo AE apresentou reduzida espessura da bainha de mielina e na expressão de P0 quando comparado com o grupo S. O grupo TE apresentou maiores valores quando comparado com os grupos S e AE em relação a variável coeficiente G, reduzida espessura da bainha de mielina e expressão de MBP quando comparado com o grupo S, valores maiores de neurofilamentos por área quando comparado com o grupo S e na expressão de P0 quando comparado com o grupo AE. O grupo ATE apresentou diâmetro da fibra nervosa, diâmetro do axônio, área da bainha de mielina e coeficiente G reduzidos quando comparado com o grupo AE e TE, valores menores da espessura da bainha de mielina quando comparado com o grupo AE, aumento de neurofilamentos por área e na expressão de P0 quando comparado com o grupo AE e redução na expressão de P0 quando comparado com o grupo TE. Concluiu-se que todos os protocolos se mostraram eficazes em alterar a morfologia nervosa de acordo com suas especificidades, onde a associação de protocolos se mostrou benéfica na promoção de novas fibras nervosas decorrente da interação de exercícios.

Palavras-chave: Nervo isquiático; alongamento estático; escalada vertical, proteína zero de mielina, proteína básica de mielina, neurofilamentos.

ABSTRACT

During the practice of physical exercise, adaptations can occur due to execution, not only in the muscle tissue, but also in other structures involved, such as the peripheral nerves. However, the resulting adaptations in the nerves aren't quite understood, especially in exercises using your own body weight. The sciatic nerve is of great importance in studies involving physical activity due to its function and location, however, the morpho-quantitative adaptations and molecular analyzes in the face of the stretching protocol and vertical ladder can elucidate possible benefits of combined practice. The aim of the present study was to analyze and describe the morpho-quantitative adaptations and protein expression of myelin zero protein (P0), myelin basic protein (MBP) and neurofilament (NF) in the sciatic nerve using the static stretching and calisthenic training protocol in vertical ladder. 24 adult Wistar rats were used, divided into 4 distinct groups: **Non-trained (NT); Static Stretching (S); Climbing training (CT); Stretched Pre-Climb Training (SCT)**. 3 animals from each group were used for the morphological variables, where they were measured on 130 nerve fibers obtained through transmission microscopy using the ImageJ® software, while for the expression of nerve components, 3 animals from each group were used for expression analysis using the Western Blot technique. Statistical tests were performed using Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test for the variables myelin sheath area, axon diameter, nerve fiber diameter, myelin sheath thickness and G-ratio; One-Way ANOVA followed by Bonferroni's post-test for the variable neurofilaments by area; and One-Way ANOVA followed by Tukey's post-test for the expression of P0, MBP and NF. The results were obtained by transmission micrographs and electrophoresis techniques (Western Blot assays), where it was possible to analyze morphometric, morphological measurements, and the expression of proteins and NF. The group S showed reduced thickness of the myelin sheath and in the expression of P0 when compared with group NT. The group CT presented higher values when compared with groups NT and S in relation to the variable G-ratio, reduced thickness of the myelin sheath and expression of MBP when compared with group NT, higher values of neurofilaments per area when compared with group NT and in the expression of P0 when compared with group S. The SCT group showed a reduced nerve fiber diameter, axon diameter, myelin sheath area and G-ratio when compared to the S and CT group, smaller values of the myelin sheath thickness when compared to the S group, with increased neurofilament by area and P0 expression when compared with the S group and reduction in P0 expression when compared with the CT group. It was concluded that all protocols proved to be effective in altering nervous morphology according to their specificities, where the association of protocols proved to be beneficial in promoting new nerve fibers resulting from the interaction of exercises.

Keywords: Sciatic nerve; *Wistar*; static stretching; vertical climb, zero myelin protein, basic myelin protein, neurofilaments.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Revisão bibliográfica:	10
1.1.1 Histórico da anatomia do Sistema Nervoso	10
1.1.2 Nervos periféricos	12
1.1.2.1 Proteínas da bainha de mielina	14
1.1.3 Alongamento	15
1.1.4 Exercício Físico	17
2. OBJETIVO GERAL	19
2.1 Objetivos específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.2. Protocolos de treinamento	20
3.2.1. Período de adaptação	20
3.2.2. Alongamento Estático	20
3.2.3. Treinamento em escada vertical	21
3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	22
3.4. Ensaios de Western Blot	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Análises morfométricas	26
4.2 Ensaios de Western blot	29
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO A - PARECER COMITÊ DE ÉTICA	47

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso periférico possui a notável função de transmitir milhares de informações provenientes do sistema nervoso central e enviá-las para as mais diversas partes do corpo. Quando falamos em exercícios físicos, prontamente associamos aos músculos estriados esqueléticos, que possuem a função de cinesia e, para que ela ocorra, é necessária a ação nervosa, e para isso, os nervos periféricos são os responsáveis por conduzir a informação ao músculo esquelético. Durante o movimento decorrente de uma atividade física o músculo sofre modificações, e as demais estruturas associadas a ele também sofrem alterações devido ao exercício (PERETTI et al., 2017). São bem compreendidos os efeitos de atividades físicas sobre a musculatura esquelética, enquanto que faltam dados e evidências sobre o efeito do treinamento na morfologia nervosa.

Por ser o maior nervo do corpo humano, o nervo isquiático possui importância em estudos com exercícios, pois além de inervar os músculos posteriores inferiores e que atuam nos movimentos de diversas articulações, sua localização tem grande importância não só na área de atividade física, mas também na área da saúde, onde inúmeras situações podem levar a irregularidades neurofuncionais (VAN DE GRAAFF, 2003). Para que a velocidade com que o impulso percorra a fibra nervosa seja maximizada, o diâmetro do axônio e a espessura da bainha de mielina se tornam fatores importantes para que ocorra essa transmissão, principalmente para a elucidação da influência da escalada vertical associada ao alongamento estático sobre a morfologia do nervo isquiático (GUEDERT, 2014). Os efeitos dessas influências sobre o nervo isquiático ainda estão incertos na literatura, sendo assim, duas possibilidades podem ser traçadas: as fibras nervosas diminuem sua espessura devido ao aparecimento de novas fibras decorrente de uma inervação mais eficaz dos músculos; ou as fibras nervosas aumentam sua espessura para fornecer de forma eficaz o impulso nervoso, aumentando assim a intensidade da força muscular exercida e consequentemente seu grau de mielinização a fim de se manter dentro do parâmetro ideal de mielinização de 0,6 (ILHA et al., 2008).

Em protocolo de treinamento em esteira rolante, observou-se que em ratos enxertados com células de Schwann no nervo isquiático neurotomizado (seccionado), ocorreu um aumento de área da bainha de mielina e no número de fibras nervosas mielinizadas devido a uma rápida regeneração pela associação das novas células implantadas ao nervo lesionado. Foram observadas também evidências de uma reinervação mais eficiente do músculo gastrocnêmio, corroborando com o fato de que durante o exercício ocorrem adaptações

neurais (GOULART et al., 2014). Diversas proteínas produzidas pelas células de Schwann estão associadas a formação de neurônios e nervos, sendo a proteína zero de mielina (P0) uma das mais importantes, pois além de participar da formação da bainha de mielina, é a primeira a ser expressa durante a recuperação de neurônios bem antes da regeneração, participando ativamente da remielinização e da formação de novas fibras, tornando-se um indicador fundamental para avaliar a ocorrência da formação de novos neurônios (SCHWEITZER, 2003). Desta forma, hipotizamos o aparecimento de novas fibras nervosas associadas a uma alteração na expressão de P0, indicando formação de novas bainhas de mielina em novas fibras nervosas. Outra proteína importante é a proteína básica de mielina (MBP, do inglês myelin basic protein), que também é componente integral da membrana e atua na manutenção e formação da bainha. Em estudos com Camundongos knock-out, foi possível observar que durante a ausência de P0, as linhas densas encontradas no interior da bainha corroboram com a afirmação encontrada em estudos anteriores sobre a expressão posterior de MBP em relação à P0, de forma que esta é essencial para a manutenção tardia da linha densa principal. Além desse fator, ambas as proteínas estão envolvidas na delimitação da espessura da bainha de mielina, uma vez que uma concentração limitante de MBP restringe a espessura da bainha por reduzir sua estabilidade enquanto que fibras que expressam maiores concentrações de P0 são mais espessas (MARTINI, 1995). Ao se comparar o efeito do treinamento intervalado de alta intensidade em esteira com o treinamento contínuo de baixa intensidade, levando em consideração a expressão de genes relacionados a confecção de mielina no hipocampo de camundongos C57BL/6, foi observado que ambos protocolos obtiveram níveis de transcrição aumentados de MBP e PLP (proteína proteolipídica da mielina), com o treinamento intervalado com maiores valores quando comparado com o grupo treinado continuamente, demonstrando a influência benéfica e protetora do exercício na morfologia nervosa através do estímulo para a síntese de proteínas essenciais que mantêm a integridade da bainha de mielina (NAGHIBZADEH et al., 2018). Deste modo, variações na espessura da bainha de mielina decorrente do grau de expressão dessas proteínas podem ser grandes indicadores de alterações morfológicas de fibras nervosas periféricas em decorrência da atividade física.

Entende-se como alongamento, os “exercícios físicos que aumentam o comprimento das estruturas constituídas de tecidos moles e (...) a flexibilidade ou a capacidade física responsável pela máxima amplitude de movimento músculo-articular (...) sem o risco de lesão” (ALMEIDA, 2007). Os benefícios do alongamento nos nervos periféricos ainda não são bem elucidados, em razão da escassez de embasamento científico na literatura vigente acerca do auxílio na condução de impulsos nervosos em decorrência a adaptações neurais.

Executar o alongamento muito próximo a prática de exercício físico pode ser prejudicial, deixando as estruturas distensas e enfraquecidas, e devido a força de execução em uma atividade física, pode resultar em lesões devido ao esforço e a não resposta das estruturas (ALMEIDA, 2007; ALENCAR, 2010). Como este estudo não possui o foco de avaliar e prevenir o surgimento de lesões antes de um exercício, o alongamento foi, obrigatoriamente, executado antes da atividade física, possibilitando assim a avaliação da influência deste quando associada ao exercício sobre os nervos periféricos. Ao ser alongado, a estrutura e comprimento do nervo são distendidos, inalterado a perfeita capacidade de transmitir o impulso nervoso, entretanto, existem poucas informações e dados morfológicos de secções transversais de nervos mediante ao alongamento estático associado à atividade física performedo in vivo disponíveis na literatura, uma vez que grande parte dos estudos necessitam de intervenção cirúrgica para realização do protocolo (SAHAR et al., 2019).

Entende-se por treinamento de resistência à atividade física que promove o aumento e manutenção da massa muscular, onde geralmente ocorrem adaptações das estruturas envolvidas (GRAVES e FRANKLIN, 2001; GABRIEL et al., 2006). O treinamento de escalada em escada vertical é utilizado quando os objetivos são investigar os efeitos do exercício em modelo experimental animal, pois além da capacidade de exercitar grande quantidade de massa muscular simultaneamente, conseguem ser verossímeis no modo de execução e nos resultados obtidos em comparação com treinamentos em humanos (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2009; KRAUSE NETO et al., 2016). Ao se avaliar a influência do protocolo de esteira sobre a morfologia do nervo vago, foram observadas neuroadaptações em decorrência do novo ambiente imposto pelo exercício, ocorrendo um aumento na área da bainha de mielina, no diâmetro do axônio, na densidade e diâmetro de fibras mielinizadas e amielínicas, bem como um maior grau de brotamento de microtúbulos e neurofilamentos por unidade. A todos esses fatores foram atribuídos um crescimento de funcionalidade do nervo vago devido a maior finalidade dessas estruturas, resultando em crescimento em diâmetro das fibras nervosas. O treinamento aeróbio promoveu um crescimento em igual proporção entre bainha de mielina e axônio (PIANCA et al., 2015).

As adaptações neurais podem ter implicações benéficas no rendimento de praticantes de atividades físicas que realizam o alongamento seguido de exercício, principalmente devido a popularização de treinos funcionais. Dessa maneira, este estudo possui caráter inovador visando elucidar as neuroadaptações frente essa associação, principalmente pelo fato de que os acréscimos de força se devem não somente a hipertrofia, mas também em decorrência ao aumento de inervação e consequente recrutamento de fibras musculares tornando a atividade

mais íntegra (GABRIEL et al., 2006). São escassos os estudos na literatura que retratam a plasticidade de nervos periféricos quando submetidos a exercícios de resistência corpórea e/ou associados ao alongamento (ILHA et al., 2008; TEODORI et al., 2011; GOULART et al., 2014). Para tal, nortear estudos futuros e auxiliar esportistas a atingirem o melhor desempenho, principalmente pela crescente prática de treinos funcionais, uma vez que com a escassez de dados morfológicos que comprovem sua beneficência para o desempenho esportivo, é de suma importância a investigação dessas neuroplasticidades nos nervos periféricos.

1.1 Revisão bibliográfica:

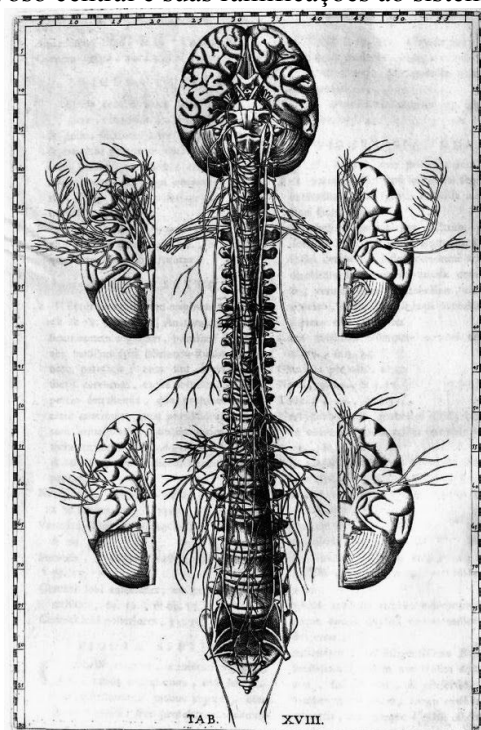
1.1.1 Histórico da anatomia do Sistema Nervoso

A curiosidade acerca do funcionamento do corpo humano acompanha o homem desde tempos imemoriais, e com isso surge o primórdio do que viria a ser denominada Anatomia, uma importante área da ciência que se faz presente nos dias atuais e ainda desperta muito interesse. Tomou-se conhecimento da existência do sistema nervoso com estudos de Hipócrates (460 a.C - 377 a.C.), com a descoberta das meninges e um prolongamento cerebral que se unia a medula espinhal, já os nervos, foram erroneamente identificados como tendões e vasos. O conhecimento sobre os componentes da incrível maquinaria responsável pelas funções do corpo continuou com Herófilo (335 a.C. - 280 a.C.) durante a antiguidade clássica na Escola de Alexandria, onde atribuiu ao cérebro a função de órgão central do sistema nervoso e sítio de inteligência e com a descoberta das duas classificações de nervos, motores e sensitivos. Posterior a ele, Galeno (129 d.C - 217 d.C.) auxiliou no início do entendimento de que determinadas lesões provocadas na coluna vertebral em modelos animais provocavam efeitos em porções diferentes do corpo. Leonardo da Vinci (1452 - 1519) também teve grande importância através dos seus desenhos impressionantes sobre o crânio humano e a arquitetura dos ventrículos. Os estudos teóricos acerca do sistema nervoso continuaram apesar do período refrado derivado da Idade Média, mas com a publicação de *De humani corporis fabrica* em 1543 por Vesalius (1514 - 1564), deu-se início a uma nova era para esta ciência (SOUZA, 2010; TALAMONI, 2012).

Nesse contexto surge Bartolomeu Eustachi (1514?- 1574), discípulo de Vesalius, onde contribuiu enormemente para a anatomia, reconhecido principalmente por suas gravuras, dentre elas, a do sistema nervoso (Figura 1). Sua obra, “*Tabulae Anatomicae*”, somente foi

publicada em dois séculos depois de ser elaborada, por Albinus, em 1744. Após a era de Vesalius, os estudos anatômicos se tornaram mais intimamente ligados com a fisiologia, mas as descobertas estavam longe de acabar. Diversos anatomistas ganharam destaque com seus estudos sobre o sistema nervoso, dentre eles podemos citar Thomas Willis (1621 - 1675) e sua descrição de diversas estruturas cerebrais em “*Cerebri anatome*”; Charles Bell (1774 - 1842) e suas ilustrações sobre o cérebro e sistema nervoso em 1802 e mais tarde na obra “*New idea of the anatomy of the brain*”, onde se aprofunda ainda mais na ideia de nervos sensoriais e motores; François Magendie (1783 - 1855) descreve de forma completa os nervos espinais e contribui com a elaboração do termo “arco reflexo” (SOUZA, 2010; TALAMONI, 2012). Todas essas figuras notáveis contribuíram construindo a sapiência que temos hoje para que, de alguma forma, os estudos atuais sobre o sistema nervoso central e periférico alcançassem lugares ainda não imaginados, fazendo de nós cientistas os responsáveis por guiar esse contínuo processo rumo ao conhecimento.

Figura 1. Ilustração elaborada pelo anatomista Bartolomeo Eustachi (XVIII) com a esquematização de forma artística do sistema nervoso central e suas ramificações ao sistema nervoso periférico.

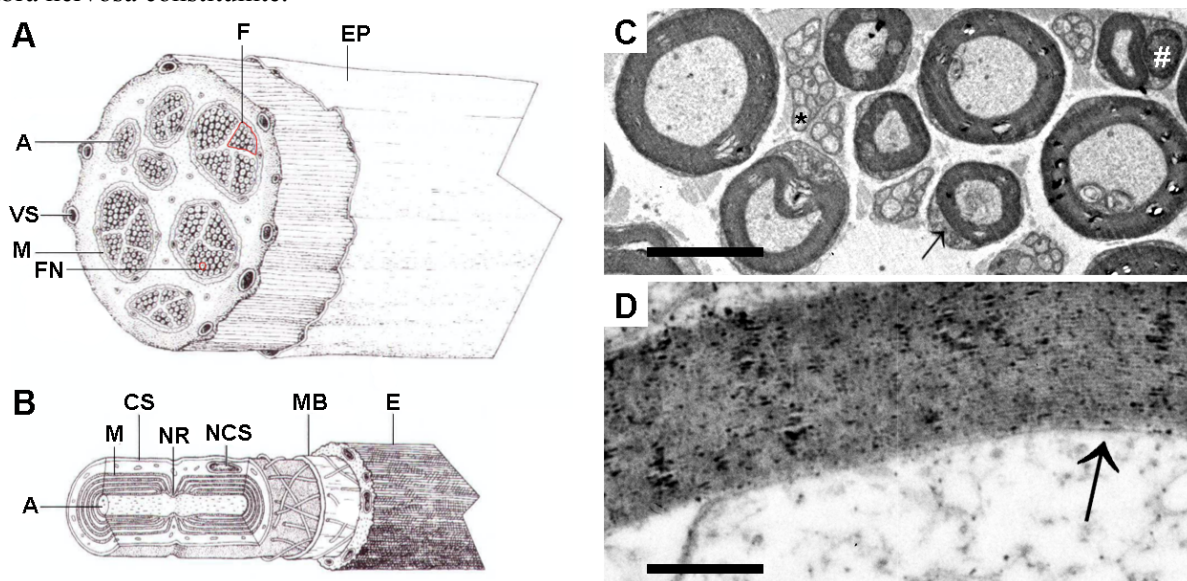


Fonte: Modificado de Dikranian (2015, p. 5). Ilustração elaborada pelo anatomista Bartolomeu Eustachi (1514?- 1574) durante o século XVI a respeito de uma dissecação e esquematização de forma artística do sistema nervoso central, periférico, gânglios nervosos e principais estruturas, qual foi publicada apenas posteriormente em 1744 por Albinus (1697-1770).

1.1.2 Nervos periféricos

Entende-se por nervo uma estrutura formada a partir da união de diversos prolongamentos axônais onde cada célula nervosa é capaz de transmitir o impulso recebido da célula anterior para a célula seguinte, e assim, promovendo a continuidade da propagação do estímulo. Todos os nervos são compostos por feixes de axônios das células nervosas, envoltos por camadas concêntricas do axoplasma de células especializadas em isolar eletricamente essa estrutura do exterior, possibilitando a propagação de uma maior quantidade de sinais simultaneamente por um pequeno espaço (Figura 2). Ao saírem do sistema nervoso central, esses feixes de axônios se ramificam progressivamente, atingindo e inervando toda a periferia corporal, possibilitando a troca de informações entre essas áreas e o sistema nervoso central. É por essa rede extensa e conectada que informações de movimentação muscular, sensação de dor, reflexos e muitas outras percorrem (VAN DE GRAAFF, 2003; KERNS, 2008; LARSON & MENG, 2020).

Figura 2. Ilustração gráfica da morfologia de uma secção transversal de um nervo periférico e uma fibra nervosa constituinte.



Fonte: Modificado de Butler, 2003 (A e B); elaborado pela autora (C e D). (A) Ilustração representativa de um nervo periférico seccionado transversalmente, e elementos estruturais como: Epineuro (EP), Feixe nervoso (F), Axônio (A), Vaso Sanguíneo (VS), Mesoneuro (M) e Fibra nervosa (FN). (B) Ilustração esquemática de uma fibra nervosa mielinizada e estruturas associadas: Endoneuro (E), Membrana Basal (MB), Núcleo da célula de Schwann (NCS), Nódulo de Ranvier (NR), Célula de Schwann (SC), Mielina (M) e Axônio (A). (C) Micrografia de transmissão demonstrando a organização das fibras nervosas dentro do nervo periférico, com citoplasma de uma célula de Schwann (seta) que recobre o nervo formando a bainha de mielina, onde também são observadas fibras amielínicas (*) e células de Schwann (#). Barra: 7,5 μ m. (D) Micrografia de transmissão demonstrando em detalhes as lamelas concêntricas da bainha de mielina em uma fibra, sendo indicada pela seta a região com melhor qualidade para visualização das dobras. Barra: 0,5 μ m

A periferia do corpo é intensamente innervada através de nervos oriundos da medula espinal, chamados nervos espinais. O corpo humano possui 31 pares de nervos espinais, divididos em 6 porções de acordo com a região emergente: 8 pares cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sacrais e 1 par coccígeo. Esses nervos possuem uma raiz anterior (ventral) composta por fibras nervosas motoras ou eferentes e uma raiz posterior (dorsal) composta por fibras sensitivas ou aferentes, onde se localizam os gânglios sensitivos, e a medida que se afastam do forame intervertebral, se ramificam intensamente, realizando a conexão do restante do corpo com o sistema nervoso central. São os axônios de nervos motores, tanto de origem espinal quanto craniana, que innervam os músculos esqueléticos (VAN DE GRAAFF, 2003; STANDRING, 2010).

Apesar da extrema importância dos nervos periféricos no bom funcionamento das atividades corporais, pouco se conhece a respeito de alterações morfológicas decorrentes do alongamento estático associado ao treinamento em escada vertical, uma vez que a ação muscular muitas vezes ganha destaque referente a atividade física devido a responsabilidade dos músculos esqueléticos de execução do movimento (GABRIEL et al., 2006). Estudos a respeito de neuromodulações sofridas mediante ao exercício associado a alongamento são escassos, e com isso se torna uma área com deficiência de informações concretas que elucidem e demonstrem adaptações da morfologia nervosa.

Alterções nervosas em razão do processo de senescência foram analisadas na morfologia do nervo tibial de ratos, e foi observada redução no volume de fibras e aumento da área e diâmetro das fibras mielinizadas como uma forma de compensação a pouca quantidade em decorrência do envelhecimento, onde aumentar a área das fibras mielinizadas se torna uma solução adotada pelo corpo. Quando aplicado protocolo de escalada em escada vertical com utilização de carga adicional, nenhuma alteração no músculo, na capacidade de transportar carga ou em alterações na espessura da bainha de mielina foram encontradas. Com isso, fica evidente a existência de muita controvérsia no meio acadêmico a respeito das alterações morfológicas que os nervos periféricos sofrem durante o processo de envelhecimento, refletindo no pouco descoberto até então sobre as variações morfológicas, em caráter geral, que os nervos sofrem, principalmente quanto a associação do alongamento à atividade física (KRAUSE NETO et al., 2017).

Uma medida importante quando falamos sobre análise de alterações estruturais em fibras nervosas é a relação matemática existente entre o diâmetro axonal interno e o diâmetro externo total da fibra, chamada de coeficiente G. Essa razão é fundamental quando se analisa o índice de mielinização ideal de nervos, e se torna muito confiável para a avaliação da

mielinização axonal bem como a velocidade de condução em relação a espessura da bainha, parâmetros importantes quando se pretende alcançar a eficiência máxima na condução do impulso nervoso. Para o sistema nervoso periférico, mais precisamente para o nervo isquiático, o grau de mielinização da fibra nervosa é ajustado em torno de 0,6. Este valor é variável para cada nervo e depende de sua localização e do número de fibras nervosas que o constituem (RUSHTON, 1951; CHOMIAK E HU, 2009).

1.1.2.1 Proteínas da bainha de mielina

Para que a transmissão do impulso seja efetiva, determinadas proteínas constituintes das células de Schwann são requeridas para formação e compactação da bainha de mielina, e estão intimamente associadas com a formação da camada isolante que recobre os nervos. Uma das proteínas mais abundante e importantes é a proteína zero de mielina (P0 ou MPZ, do inglês myelin protein zero), onde além de participar ativamente da formação da bainha através da estabilização das linhas intraperíodo da mielina periférica, é a proteína inicialmente expressa durante o processo de recuperação de um neurônio e anterior a regeneração deste, além de participar ativamente da remielinização e da formação de novas fibras, e devido a isso, se torna um indicador fundamental da ocorrência e formação de novos neurônios. Outra proteína importante na manutenção, formação e reparação da bainha é a proteína básica de mielina (MBP, do inglês myelin basic protein). Ela é a responsável pela formação da linha densa principal da bainha de mielina e também atua na compactação da mesma (SCHWEITZER, 2003; AGGARWAL et al., 2013; DA SILVA et al., 2015; TSUGE, 2020).

Em estudos com camundongos knock-out, na ausência de P0, a análise das linhas densas encontradas no interior da bainha corroboram com a afirmação encontrada em estudos anteriores sobre a expressão posterior de MBP em relação à P0, onde esta é essencial para a manutenção tardia da linha densa principal. Ademais, ambas estão envolvidas na determinação da espessura da bainha de mielina, além da observação que uma concentração limite de MBP reduz a estabilidade da bainha de mielina e restringe sua espessura, enquanto que em fibras nervosas que expressam maiores concentrações de P0 apresentam-se mais espessas (MARTINI, 1995). Apesar disso, ambas as proteínas parecem possuir propriedades moleculares semelhante quando na mielina, embora estudos mais recentes afirmam que P0 não necessariamente tem o mesmo papel, ou até mesmo semelhante, a MBP na formação da principal linha densa, embora ela também seja apta a unir membranas (RAASAKKA et al., 2019).

Em relação a expressão de genes relacionados a proteínas constituintes da mielina no hipocampo de camundongos C57BL/6, quando se compara o efeito do treinamento de alta intensidade feito em intervalos em esteira com o treinamento contínuo de baixa intensidade, ambos protocolos obtiveram níveis de transcrição aumentados de MBP e PLP (proteína proteolipídica da mielina), com o treinamento intervalado com maiores valores quando comparado com o grupo treinado continuamente, e dessa forma, demonstra a influência benéfica e protetora do exercício na morfologia nervosa através do estímulo para a síntese de proteínas essenciais que mantêm a integridade da bainha de mielina (NAGHIBZADEH et al., 2018). Ademais, o aumento da expressão dessas proteínas pode estar fortemente atrelado a uma maior neoformação de fibras em decorrência da atividade física, uma vez que essa eleva os níveis de certas neurotrofinas que auxiliam na manutenção, sobrevivência e regeneração de neurônios, onde também podem influenciar na divisão e surgimento de novas fibras nervosas (WEHRWEIN; ROSKELLEY; SPITSBERGEN, 2002; COBIANCHI et al., 2013; WHITEHEAD, 2017).

1.1.3 Alongamento

O alongamento é a prática de “exercícios físicos que aumentam o comprimento das estruturas constituídas de tecidos moles e, conseqüentemente, a flexibilidade ou a capacidade física responsável pela máxima amplitude de movimento músculo-articular de uma ou mais articulações sem o risco de lesão”, entretanto, a execução do alongamento seguida de exercícios físicos pode ser nociva ao corpo, uma vez que este tende a deixar as estruturas frouxas e enfraquecidas, podendo ocasionar lesões decorrente da não resposta em virtude do esforço realizado sobre as estruturas (ALMEIDA, 2007; RAMOS et al., 2007; ALENCAR, 2010). Entretanto, para a neuromorfologia, a ação de alongar os componentes adjacentes implica em uma redução da sensibilidade neural do músculo esquelético, muito provavelmente através de uma redução de estímulos fornecidos, todavia, não são bem elucidadas as alterações decorrentes da prática sobre as células nervosas, principalmente unido ao entendimento e atual conhecimento da comunidade científica (AVELA; KYROLAINEN; KOMI, 1999; GUISSARD; DUCHATEAU; HAINAUT, 2001; GUISSARD; DUCHATEAU, 2004).

Existe ainda muita controvérsia sobre a beneficência da prática seguida de exercícios (WALL et al., 1992; CRAMER et al., 2004; WRIGHT, et al., 2005; GOODWIN et al., 2020), principalmente quanto ao entendimento da morfologia nervosa, que não está muito bem elucidada, ou ao menos existem dados morfológicos suficientes que comprovem quais são as

adaptações e se estas auxiliam na condução de impulso nervoso. Quando submetida a alongamento estático, a estrutura do nervo e seu comprimento são alongados, uma vez que as fibras nervosas, principalmente em articulações com maior amplitude de movimento, tenham uma porção de folga e estruturas mais livres para serem distendidas quando necessário, o que resulta na não alteração da capacidade de transmitir o impulso nervoso (SUNDERLAND, 1990; BUTLER, 2003; KAMIJO et al., 2014; SAHAR et al., 2019; LARSON & MENG, 2020). Ainda sim, existem poucos dados morfológicos acerca do alongamento estático performedo in vivo sem a intervenção cirúrgica, principalmente quanto a neuromodulações ocorridas nas seções transversais de nervos mediante a alongamento estático associado à atividade física.

Estudos afirmam que com a prática do alongamento, ocorrem alterações na transmissão do impulso nervoso e na rigidez musculotendínea, afetando diretamente o desempenho muscular, entretanto, quando executado de forma repetida (sem tempo de pausa entre as séries) os distúrbios ocasionados são mais evidente do que quando alongado de forma contínua, ou seja, sem intervalo de pausa nenhum (WATANABE et al., 2001; NOÓBREGA; PAULA; CARVALHO, 2005). Além do tempo de pausa, a duração do alongamento é o um fator que exerce grande influencia na morfologia nervosa, onde em sessões mais demoradas (superior a 5 minutos), os efeitos no nervo mediano direito de seres humanos demonstrou não atrasar a condução do impulso ou comprometer o nervo, diferentemente do observado em sessões mais curtas, (um minuto), onde houve pico de atividade nervosa mas nenhum dano neural (LEE et al., 2018).

É visto que quando combinado a exercícios de resistência, resulta em uma maior hipertrofia muscular. Entretanto, tais adaptações ocorrem somente quando um limiar é atingido, ou seja, atividades de baixa intensidade como por exemplo a prática isolada do alongamento ou deste unido a exercícios de resistência, não expressam mudanças consideráveis por não alcançarem os limites mínimos (NUNES et al., 2020). Apesar disso, percebe-se certa segregação quando se fala no efeito de atividades sobre nervos, e atribui-se tais modificações a componentes fisiológicos ou mesmo a estruturas adjacentes ao músculo.

É notável que ainda restam questionamentos a respeito dos efeitos diretos do alongamento sobre a morfologia nervosa, e com isso forma-se uma grande lacuna em detrimento a falta de dados morfológicos e de consenso tem influência direta na tomada de decisões de quando, como e se devem realizar o procedimento, o que resulta em dúvidas a respeito sobre se os efeitos a longo prazo afetam a força muscular e o aparecimento de novas adaptações neurais.

1.1.4 Exercício Físico

O objetivo de se praticar o treinamento resistido é o ganho e a manutenção de massa muscular e consequentemente, o restante das estruturas em derredor também sofrem alterações, ou mesmo devido a componentes fisiológicos liberados durante a prática de atividades físicas podem influenciar esses componentes a sofrerem alterações (GRAVES e FRANKLIN, 2001; WEHRWEIN; ROSKELLEY; SPITSBERGEN, 2002; GABRIEL et al., 2006; GUEDERT, 2014; SAKITA et al., 2020). Os exercícios de cunho funcional almejam mimetizar os movimentos realizados diariamente, certificando assim, transferir as adaptações adquiridas durante o treino para a rotina pessoal do indivíduo, e devido a crescente popularidade desses exercícios, diversos praticantes buscam essa modalidade como uma alternativa de inovar e diversificar o treino. Todavia, ainda existem controvérsias na literatura a respeito da melhora de função em diversos aspectos da saúde física (WEISS et al., 2010; SOLBERG et al., 2013; FEITO; BROWN; OLMOS, 2019; MCWEENY et al., 2020), principalmente quanto à comprovação de uma maior eficácia frente a exercícios de resistência tradicionais e sobretudo em alterações promissoras na morfologia nervosa decorrente de sua execução.

Apesar de diversamente explorada, o modo como a atividade física age sobre a morfologia nervosa ainda não é totalmente compreendida, mas sabe-se que ela auxilia em diversos processos, podendo exercer papel de catalizador fundamental durante o processo de regeneração nervosa, protege as estruturas de lesões decorrente de exercícios, ajuda na manutenção da cognição, mantém a massa muscular e também possui função de antidepressivo natural (TEODORI et al., 2011; ENGLISH; WILHELM; SABATIER, 2011; SEO et al., 2014; TARI et al., 2019). Alterações de tamanho do diâmetro de fibras do nervo femoral de ratos Wistar idosos decorrentes da influência do exercício aeróbico em esteira evidenciam que de fato as atividades físicas possuem influência direta não só nos constituintes musculares, mas também nos nervos periféricos, assumindo um papel protetor contra o processo natural de envelhecimento nervoso (BEGA et al., 2018).

Em estudos que se utilizam de modelos animais, atrelado ao uso de escada vertical, tem se mostrado mais eficazes em comparação com outros modelos de experimentação animal quando relacionados com exercício, por atingir verossimilhança no modo de execução e nos resultados obtidos quando comparado com treinamentos humanos (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2009; KRAUSE NETO et al., 2016). Contudo, as adaptações neuromorfológicas decorrente de atividades físicas encontradas em roedores não

conseguem ainda espelhar os resultados que seriam observados em humanos em decorrência de diversos tipos de protocolos diferentes disponíveis na literatura. Desse modo, se faz necessária uma padronização para que os resultados possam refletir as alterações humanas, principalmente em estudos que visem a melhora da qualidade de vida e desempenho de esportistas e atletas (SEO et al., 2014; DESCHENES, 2019).

Ao se avaliar a influência do protocolo de esteira sobre a morfologia do nervo vago, foi observado uma mudança da dinâmica corporal muda, o que resulta no crescimento de funcionalidade do nervo devido uma maior finalidade dessas estruturas, e com isso um aumento na área da bainha, número e diâmetro de fibras mielinizadas, amielínicas e axônio, bem como uma maior aparição de microtúbulos e neurofilamentos por unidade (PIANCA et al., 2015). Ademais, em protocolo de escalada vertical, as neuroadaptações observadas no nervo radial de ratos Wistar jovens submetidos ao protocolo de treinamento resistido com carga adicional decorreram do uso de carga durante a escalada, o que ocasionou maior área média e diâmetro dos axônios e fibras nervosas, área média e espessura da bainha de mielina, neurofilamentos e microtúbulos no grupo treinado com maior carga em relação ao grupo treinado com a carga mais leve. Somado a isso, os ratos que carregam cargas maiores obtiveram aumento de força proporcionalmente maior quando comparados com ratos que carregam cargas menores (CARBONE et al., 2017).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo consistiu em descrever de forma morfoquantitativa as adaptações das fibras nervosas através de microscopia eletrônica de transmissão e revelar a expressão da proteína zero da mielina (P0), proteína básica de mielina (MBP) e neurofilamentos (NF), do nervo isquiático mediante a protocolo de alongamento estático associado ao treinamento de escalada vertical em ratos *Wistar* adultos.

2.1 Objetivos específicos

- Descrever as características ultraestruturais das fibras nervosas através da microscopia eletrônica de transmissão;
- Mensurar a área e espessura da bainha de mielina, os diâmetro do axônio e da fibra nervosa, neurofilamentos por área e inferir o coeficiente G;
- Revelar a expressão da proteína zero de mielina (P0) da proteína básica de mielina (MBP), bem como neurofilamentos (NF), através de ensaios de Western Blot.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para realização deste estudo, foram utilizados 24 ratos *Wistar* adultos com 90 dias de idade, mantidos em gaiolas de plástico com dimensões 41x34x18cm e grade de ferro acoplada, contendo em cada uma 4 animais. Estes foram mantidos no Biotério do Laboratório de Anatomia Humana - IB - Rio Claro - SP à temperatura controlada de $23\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de claro/escuro de 12 horas e água e ração balanceada *ad libitum*. Os animais foram divididos em 4 grupos, cada um contendo 6 animais: **Grupo Sedentário (S)**: não foi submetidos a nenhum protocolo de treinamento; **Grupo Alongamento Estático (AE)**: foram submetidos ao protocolo de alongamento estático; **Grupo Treinamento de escalada (TE)**: foram submetidos ao treinamento em escada vertical; **Grupo Alongamento Pré-Treinamento de escalada (ATE)**: foram submetidos primeiro ao protocolo de alongamento estático e em seguida ao treinamento em escada vertical. Todos os protocolos foram realizados 3 vezes na semana durante o período de 8 semanas, com um total de 24 sessões de treinamento e todos os procedimentos aplicados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (nº 08/2020) (anexo A).

3.2. Protocolos de treinamento

3.2.1. Período de adaptação

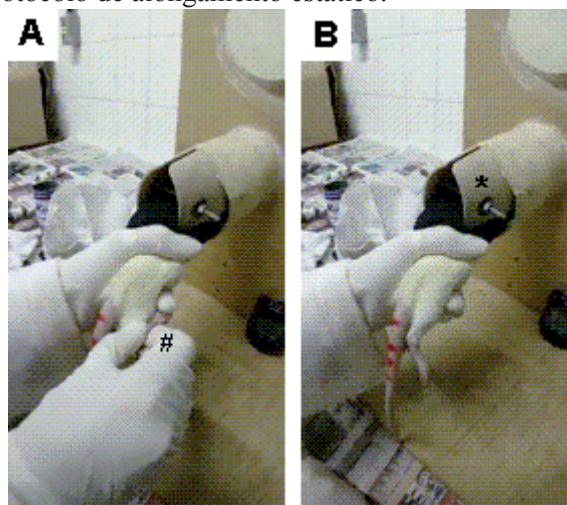
Após a obtenção dos animais e delimitação dos grupos, os indivíduos pertencentes aos grupos TE e ATE passaram por um período de adaptação durante uma semana, 3 vezes na semana, onde estes foram posicionados a partir do meio da escada vertical a fim de realizarem 5 escaladas com tempo de descanso de 60 segundos entre elas. O período de adaptação consiste no processo de familiarização do animal ao manuseio reduzindo a fim de que seja reduzido o estresse em decorrência do protocolo de treinamento (KRAUSE NETO et al., 2016; SEO et al., 2014).

3.2.2. Alongamento Estático

Os animais pertencentes ao grupo AE realizaram o protocolo de alongamento estático consistiu no posicionamento do membro posterior direito em extensão do joelho, e

dorsiflexão da articulação talocrural durante 10 séries de 30 segundos cada (Figura 3), com descanso de 30 segundos entre cada série (GIANELO et al., 2016). O grupo associado ATE também realizou o protocolo de alongamento estático prévio ao protocolo de treinamento em escada vertical.

Figura 3. Fotografia do protocolo de alongamento estático.



Fonte: Elaborada pela autora. (A) Posicionamento do animal durante o alongamento do membro posterior direito em extensão do joelho, e dorsiflexão da articulação talocrural com auxílio de aparelho de alongamento para contenção do animal, e manualmente executado o movimento de dorsiflexão da articulação talocrural (#) do membro posterior direito do animal. (B) Posição de descanso do animal durante os intervalos das séries dentro do equipamento de contenção (*) confeccionado em madeira, canos de PVC e ferragens que promoveram a contenção do animal durante a execução do protocolo.

3.2.3. Treinamento em escada vertical

O protocolo de escada vertical consistiu nos animais dos grupos TE e ATE realizarem 9 escaladas sem sobrecarga, somente com o próprio peso corporal, iniciando na base da escada em direção ao topo, com um intervalo de descanso de 60 segundos entre as escaladas (Figura 4) (HORNBERGER; FARRAR, 2004).

Figura 4. Fotografia de um animal durante a execução do protocolo de treinamento de escada vertical.



Fonte: Elaborada pela autora. Fotografia de um animal realizando a escalada em escada vertical onde em seu topo possui uma contenção de ferro com uma abertura na parte superior e frontal da escada, servindo de local de descanso dos animais durante os intervalos das séries (*).

3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para obtenção das microscopias e posterior análises das variáveis em questão, 3 animais de cada grupo experimental foram eutanasiados com overdose de anestésico via intraperitoneal (Ketamina 50 mg/Kg e Xilazina 10 mg/Kg) e posteriormente perfundidos com solução de Karnovsky modificada (2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4) por 48h a 4°C (BARBOSA et al., 2020). Os nervos isquiáticos foram dissecado bilateralmente e seccionadas amostras de 3 mm³, pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 1% a 4°C por 2h, imersas em solução aquosa de acetato de uranila a 5%, desidratadas em série crescente de alcoóis, imersas em óxido de propileno e incluídas em resina Spurr[®] (Electron Microscopy Sciences, USA). Foram obtidas secções ultrafinas de 60 nm coletadas em telas de cobre de 200 “*mesh*” (Sigma-Aldrich, USA), contrastadas com acetato de uranila 4% e com citrato de chumbo à 0.4%, ambos por 3 minutos (SIERRA et al., 2018, JACOB et al., 2019). As telas foram analisadas através do Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 1010 do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA), da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, Brasil.

Foram obtidas 20 micrografias de transmissão por grupo com ampliação de 2.000x para a morfometria das variáveis de diâmetro da fibra nervosa e axônio, espessura e área da bainha de mielina e coeficiente G, e obtidas 2 micrografias de transmissão por grupo com

ampliação de 30.000x para morfometria do número de neurofilamentos por fibra nervosa, onde a partir disso realizou-se a inferência de aproximadamente 700 neurofilamentos. A partir das microscopias, com o auxílio do software ImageJ[®] foram mensurados os diâmetros das fibras nervosas e dos axônios, área e espessura da bainha de mielina, relação de neurofilamentos por área da secção nervosa e a relação do coeficiente G.

A respeito da mensuração das variáveis de diâmetro, as fibras nervosas foram consideradas circunferências perfeitas a fim de otimizar os cálculos, onde começou-se traçando o perímetro da fibra nervosa, que inclui a porção da bainha de mielina, perímetro este que corresponde a variável diâmetro da fibra, bem como foi também traçado o perímetro da porção interna da fibra nervosa, correspondendo somente a porção axonal, perímetro este que se refere ao diâmetro do axônio. Estes valores foram convertidos para diâmetro através da dedução de uma fórmula matemática simples:

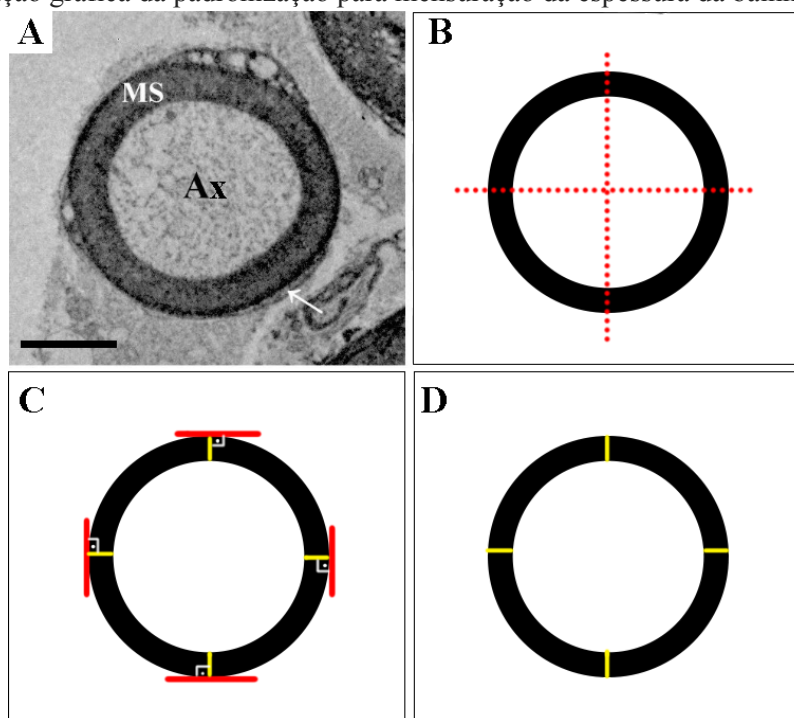
$$\begin{aligned} \textit{Perímetro} &= 2 \cdot \textit{raio} \cdot \pi \\ \textit{Perímetro} &= \textit{Diâmetro} \cdot \pi \\ \textit{Diâmetro} &= \textit{Perímetro} / \pi \end{aligned}$$

Sabe-se que se multiplicado por dois o valor do raio se obtém matematicamente o diâmetro e dividindo o valor do perímetro por π (pi), é possível obter o diâmetro da circunferência. O valor aproximado utilizado para π foi de 3,14159265359.

A respeito da variável espessura da bainha de mielina, foi utilizada ferramenta “*Straight*” do software, realizando quatro medições em cada fibra nervosa de modo que essas quatro medições obedecessem um padrão pré-determinado em formato de , onde cada ponto se alinhava com os ângulos 0°, 90°, 180° e 270° de um círculo trigonométrico. Em seguida foi traçada uma linha que formava um ângulo de 90° com uma tangente imaginária a porção externa da bainha de mielina (Figura 5), onde essa linha foi utilizada para poder inferir a espessura da bainha. A variável área da bainha de mielina foi estabelecida subtraindo-se o valor encontrado para a área da fibra nervosa do valor encontrado da área do axônio, obtidas automaticamente pelo software quando o perímetro foi calculado. As medições foram realizadas apenas onde a bainha não apresentava nenhuma dobra ou artefato histológico devido ao processamento durante o corte, incisuras de Schmidt-Lantermann e somente onde era possível ver com clareza os seus contornos. Foram contabilizados manualmente as estruturas identificadas para compor a variável de neurofilamento por área. Para determinação da área a ser analisada, foi subtraído o valor da área onde esses filamentos se localizavam do

valor da área da imagem que apresentava outras estruturas, como por exemplo porções da imagem que continham bainha de mielina, restando a área correspondente ao conteúdo axonal que continha os neurofilamentos. Esse processo ocorreu de forma individual para cada imagem e então o número de neurofilamentos obtido na imagem foi dividido pelo valor da área previamente calculado para aquela determinada imagem, e então realizada uma média de valor entre as imagens mensuradas e obtido o valor da variável apresentado a seguir.

Figura 5. Ilustração gráfica da padronização para mensuração da espessura da bainha de mielina.



Fonte: Elaborado pela autora. Ilustração exemplificada da padronização para mensuração da espessura da bainha de mielina. **(A)** Micrografia de uma fibra nervosa com a bainha de mielina (MS), o axônio (Ax) e o citoplasma da Célula de Schwann (seta). Barra: 0,5 μm . **(B)** Padrão estabelecido para as medições em forma de cruz. **(C)** Em amarelo, traços correspondentes às posições 0°, 90°, 180°, 270° de um círculo trigonométrico. O traço foi determinado seguindo uma tangente externa a bainha (traço vermelho), formando um ângulo de 90° com o traço amarelo. **(D)** Representação esquemática da visão fornecida pelo software ImageJ® após feitos os traçados das medições.

Após mensuradas as variáveis, o teste de Shapiro-wilk foi performedo em todas as variáveis, e após analisadas quanto a sua normalidade, foram executados os testes estatísticos pertinentes. As variáveis área da bainha de mielina, diâmetro do axônio, diâmetro da fibra nervosa, espessura da bainha de mielina e razão G foram analisadas por meio do teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, onde o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$; e a variável neurofilamento por área foi analisada através do teste de ANOVA One-Way seguida do pós-teste de Bonferroni, onde o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3.4. Ensaios de Western Blot

Para as análises de Western blot, foram utilizadas amostras de 3 animais de cada grupo. Todos os grupos S, AE TE e ATE foram sacrificados por overdose de anestésico intraperitoneal (ketamina 200 mg/kg e xilazina 50 mg/kg) e, em seguida, os nervos isquiáticos foram dissecados e transferidos para um tubo contendo 100 µL de tampão de extração (100 mM de Tris, pH 7,4, 1% de SDS, 10 mM de EDTA, 2 mM de PMSF e 10 µg/mL de aprotinina) em gelo (4° C). As amostras de nervos isquiáticos foram homogeneizadas separadamente usando um processador ultrassônico (Sonics & Materials, Newtown, PA). Os homogenatos foram então centrifugados a 12.000 rpm a 4° C por 20 minutos, e a concentração de proteína do sobrenadante foi determinada usando o ensaio de proteína de Bradford com albumina como padrão (Bio-Rad, EUA) (BRADFORD, 1976). Amostras contendo 20 µg de proteína foram carregadas em gel de gradiente de acrilamida (MILLER; ROMAN; NORSTROM, 2016) e transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose usando um aparelho de transferência em miniatura Bio-Rad por 1,5 h a 120 V. Após a transferência, as membranas foram tratadas por 2 horas à temperatura ambiente (23±2° C) com uma solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó, lavadas e incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpos primários (Tabela 1). As membranas foram então lavadas e incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário peroxidase-conjugated anti-rabbit diluído em 1: 5000 (ZIMED Laboratories Inc). Em todos os experimentos de immunoblotting, a beta tubulina (anti-beta tubulina, 1: 5000; Abcam) foi utilizada como controle interno. A ligação do anticorpo foi visualizada usando um kit de quimioluminescência (Clarity Max Western ECL Substrate, BIO-RAD Laboratories; Itália). As bandas foram corrigidas pela densidade óptica da beta tubulina (1: 5000, Abcam) e foram consideradas as amostras do grupo controle (S como controle de AE e TE; e AE e TE como controle de ATE) como padrão para normalização. Para a quantificação, a densitometria foi realizada utilizando o NIH-Scion Image 4.0.2, quantificadas por densitometria óptica das autorradiografias desenvolvidas (Scion Corporation, EUA).

Após inferidas as expressões proteicas e de neurofilamentos, foi realizado o de ANOVA One-Way seguida do pós-teste de Tukey para todas as variáveis, onde o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 1. Anticorpos primários - ensaio de Western blot.

Anticorpo	Espécie hospedeira	Peso molecular	Diluição	RRID
P0	Rabbit	28 KDa	1:500	AB_2144668
MBP	Rabbit	22 KDa	1:500	AB_1141521
NF	Rabbit	200 KDa	1:500	AB_477272
Beta-tubulina	Rabbit	55 KDa	1:5000	AB_2210370

Fonte: Elaborado pela autora.

4. RESULTADOS

Os resultados aqui apresentados foram obtidos a partir das análises das expressões e micrografias eletrônicas das variáveis seguido pela inferência do teste estatístico apropriado.

4.1 Análises morfométricas

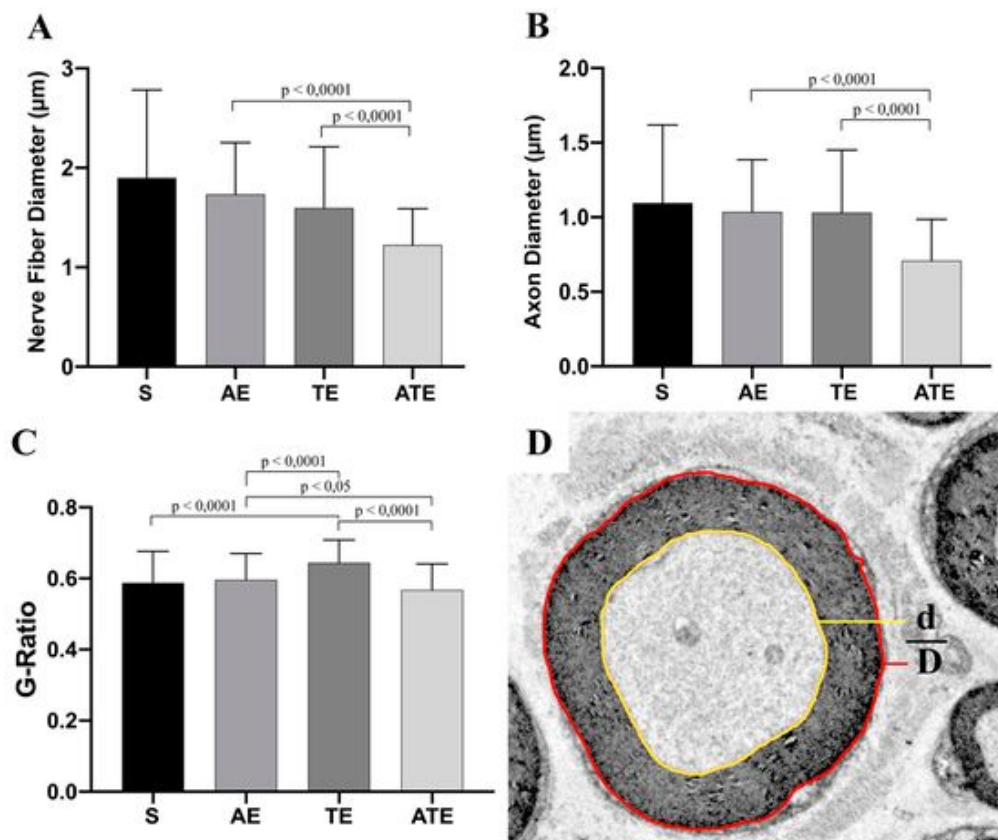
O grupo AE apresentou diminuição de 8,58% em relação ao grupo S para o diâmetro da fibra ($p > 0,05$). Em relação ao diâmetro do axônio, houve diminuição de 5,42% em relação ao grupo S ($p > 0,05$). Para a variável coeficiente G, houve um aumento de 1,45% em relação ao grupo S ($p > 0,05$).

O grupo TE apresentou diminuição de 15,91% quando comparado com o grupo S ($p > 0,05$) e diminuição de 8,02% quando comparado com o grupo AE ($p > 0,05$) para a variável diâmetro da fibra. Em relação ao diâmetro do axônio, houve diminuição de 6% em relação ao grupo S ($p > 0,05$) e diminuição de 0,62% em relação ao grupo AE ($p > 0,05$). Houve aumento de 9,62% quando comparado com o grupo S ($p < 0,0001$) e aumento de 8,05%, respectivamente, quando comparado com o grupo AE ($p < 0,0001$) em relação ao coeficiente G.

O grupo associado ATE apresentou diminuição de 29,43% quando comparado com o grupo AE ($p < 0,0001$) e diminuição de 23,28% quando comparado com TE ($p < 0,0001$) em relação ao diâmetro da fibra nervosa. Sobre o diâmetro do axônio, houve diminuição de 31,54% quando comparado com o grupo AE ($p < 0,0001$) e diminuição de 31,11% comparado com TE ($p < 0,0001$). Para o coeficiente G, houve diminuição de 4,9 % quando comparado com o grupo AE ($p < 0,05$) e diminuição de 11,99% quando comparado com TE ($p < 0,0001$).

Os gráficos obtidos após a análise dessas variáveis morfológicas com suas respectivas significâncias estão demonstrados na figura abaixo (Figura 6).

Figura 6. Análises morfométricas de variáveis da fibra nervosa.



Fonte: Elaborado pela autora. Análises morfométricas das variáveis: Diâmetro da fibra, diâmetro do axônio e coeficiente G, bem como inferência do coeficiente G dos grupos Sedentário (S), Alongamento Estático (AE), Treinamento de escalada (TE) e Alongamento Pré-Treinamento de Escalada (ATE). **(A)** Médias e desvio padrão do diâmetro da fibra nervosa (µm) (n = 130). ATE ≠ AE e ATE ≠ TE (p < 0,0001). Análise estatística: Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn (p < 0,05). **(B)** Médias e desvio padrão do diâmetro do axônio (µm) (n = 130). ATE ≠ AE e ATE ≠ TE (p < 0,0001). Análise estatística: Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn (p < 0,05). **(C)** Médias e desvio padrão da inferência do coeficiente G (n = 130). TE ≠ S; ATE ≠ TE e TE ≠ AE (p < 0,0001) e ATE ≠ AE (p < 0,05). N = 130; Análise estatística - Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn (p < 0,05). **(D)** Micrografia de transmissão de uma fibra nervosa para inferência do coeficiente G: Divisão dos valores de diâmetro interno (d) e diâmetro externo (D). Ampliação: 2.000x

O grupo AE apresentou diminuição significativa de 21,6% na espessura da bainha de mielina quando comparado com o grupo S (p < 0,05). Houve uma diminuição de 15,62% na área da bainha de mielina quando comparado com o grupo S (p > 0,05). Em relação a neurofilamentos por área, houve uma diminuição de 1,75% quando comparado com o grupo S (p > 0,05).

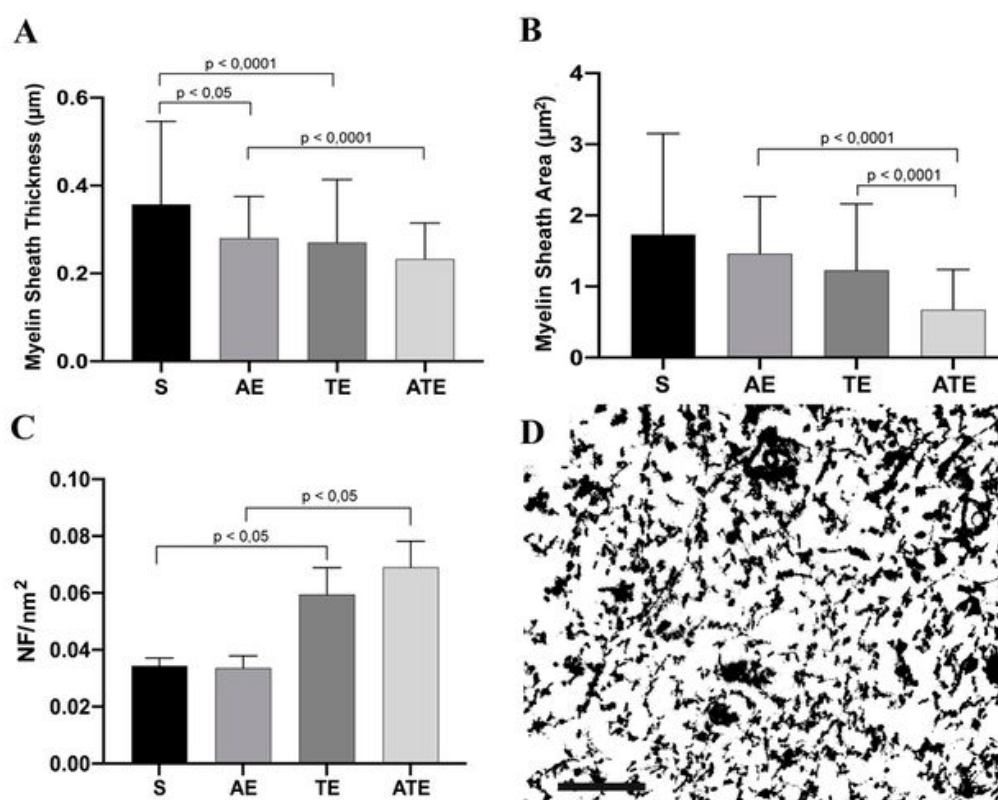
O grupo TE apresentou diminuição significativa de 24,41% na espessura da bainha de mielina quando comparado com o grupo S (p < 0,0001) e diminuição de 3,64% quando comparado com o grupo AE (p > 0,05). Houve uma diminuição de 28,94% quando comparado com o grupo S (p > 0,05) e diminuição de 15,79% quando comparado com o

grupo AE ($p > 0,05$) em relação a área da bainha de mielina. Foi observado um aumento de 73,47% no valor de neurofilamentos por área quando comparado com o grupo S ($p < 0,05$) e um aumento de 76,56% quando comparado com o grupo AE ($p > 0,05$).

O grupo associado ATE apresentou diminuição significativa na espessura da bainha de mielina em 16,95% quando comparado com o grupo AE ($p < 0,0001$) e diminuição de 13,81% quando comparado com o grupo TE ($p > 0,05$). Além disso, houve diminuição de 53,99% quando comparado com o grupo AE ($p < 0,0001$) e diminuição de 45,36% quando comparado com o grupo TE ($p < 0,0001$) para a área da bainha de mielina. Foi observado um aumento de 104,75% quando comparado com o grupo AE ($p < 0,05$) e aumento de 15,97% quando comparado com o grupo TE ($p > 0,05$) em relação a neurofilamentos por área.

Os gráficos obtidos após a análise dessas variáveis morfológicas com suas respectivas significâncias estão demonstrados na figura abaixo (Figura 7).

Figura 7. Análises morfométricas da fibra nervosa e neurofilamentos dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora. Análise morfométrica das variáveis: Espessura e área da bainha de mielina e densidade de neurofilamentos por área (nm^2) dos grupos Sedentário (S), Alongamento Estático (AE), Treinamento de escalada (TE) e Alongamento Pré-Treinamento de Escalada (ATE). **(A)** Médias e desvio padrão da espessura da bainha de mielina (μm) ($n = 130$). $\text{AE} \neq \text{S}$ ($p < 0,05$) e $\text{ATE} \neq \text{AE}$ e $\text{TE} \neq \text{S}$ ($p < 0,0001$). Análise estatística: Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). **(B)** Médias e desvio padrão da área da bainha de mielina (μm^2) ($n = 130$). $\text{ATE} \neq \text{AE}$ e $\text{ATE} \neq \text{TE}$ ($p < 0,0001$). Análise estatística: Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). **(C)** Médias e desvio padrão da quantidade de neurofilamento por área (nm^2) ($n=2$). $\text{TE} \neq \text{S}$ e $\text{ATE} \neq \text{AE}$ ($p < 0,05$).

Análise estatística: ANOVA one-way seguida do pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). **(D)** Imagem binarizada, através do software ImageJ®, de neurofilamentos. Barra: 1 nm.

A tabela a seguir reúne os resultados das variáveis morfométricas analisadas, obtidos após as análises estatísticas pertinentes (Tabela 2).

Tabela 2. Relação comparativa dos grupos experimentais com valores de significância (p)

Pares de grupos	Diâmetro da fibra (μm)	Diâmetro do axônio (μm)	Coefficiente G	Área da bainha (μm^2)	Espessura da bainha (μm)	NF/ nm^2
S-AE	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05
S-TE	> 0,05	> 0,05	< 0,0001	> 0,05	< 0,0001	< 0,05
TE-AE	> 0,05	> 0,05	< 0,0001	> 0,05	> 0,05	> 0,05
AE-ATE	< 0,0001	< 0,0001	< 0,05	< 0,0001	< 0,0001	< 0,05
TE-ATE	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	> 0,05	> 0,05

Fonte: Elaborado pela autora. Relação comparativa das variáveis mensuradas entre os grupos Sedentário (S), Alongamento Estático (AE), Treinamento de escalada (TE) e Alongamento Pré-Treinamento de Escalada (ATE) com respectivos valores de significância nas variáveis de área da bainha de mielina, diâmetro do axônio, diâmetro da fibra nervosa, espessura da bainha de mielina e coeficiente G analisadas estatisticamente através do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) e neurofilamento por área (NF/ nm^2) analisada através de ANOVA One-Way com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

4.2 Ensaios de Western blot

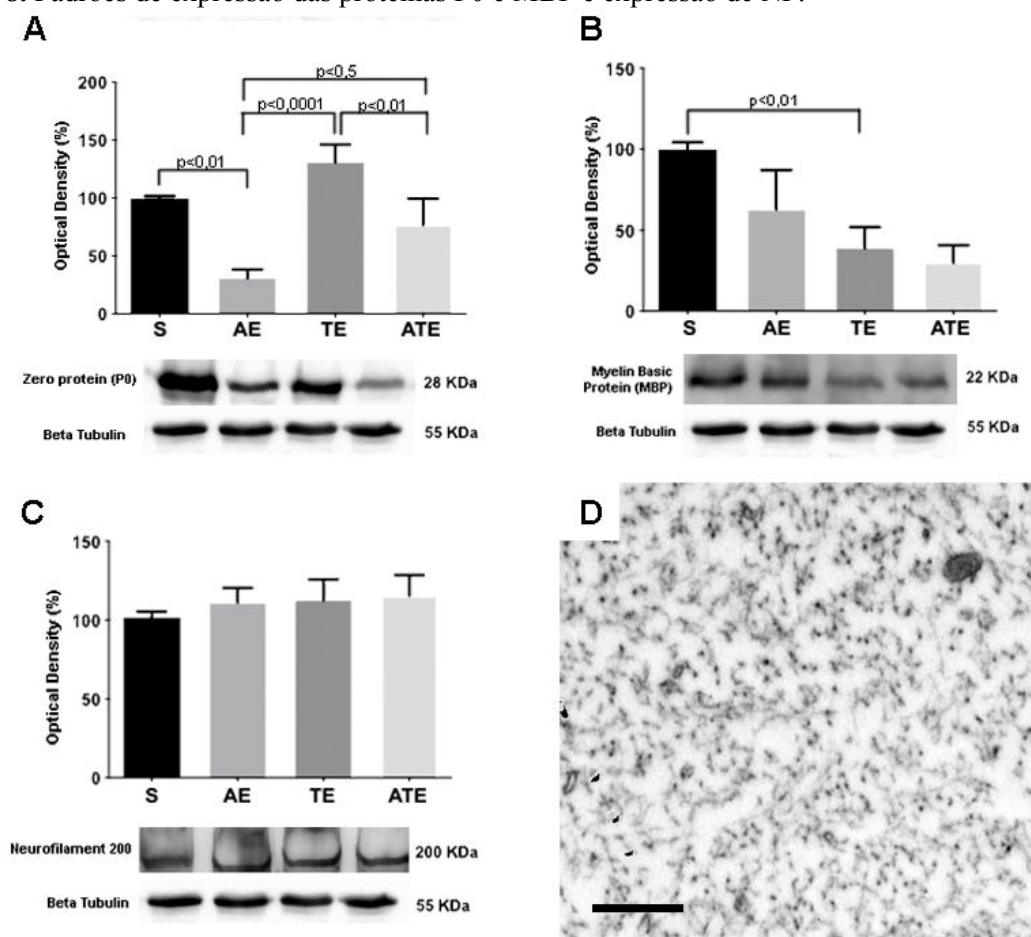
O grupo AE apresentou diminuição de 68,76% na expressão de P0 quando comparado com o grupo S ($p < 0,01$). Em relação a expressão de MBP, houve uma diminuição de 36,79% quando comparado com o grupo S ($p > 0,05$). Sobre a expressão de NF, houve um aumento de 9,51% em relação ao grupo S ($p > 0,05$).

O grupo TE apresentou um aumento de 31,51% quando comparado com o grupo S ($p > 0,05$) e aumento de 321% quando comparado com o grupo AE ($p < 0,0001$) em relação à expressão de P0. Também ocorreu uma diminuição de 60,87% na expressão de MBP quando comparado com o grupo S ($p < 0,01$) e diminuição de 38,1% quando comparado com o grupo AE ($p > 0,05$). Sobre a expressão de NF, houve um aumento de 10,82% em relação ao grupo S ($p > 0,05$) e um aumento de 1,2% em relação ao grupo AE ($p > 0,05$).

O grupo ATE apresentou aumento de 147,52% quando comparado com o grupo AE ($p < 0,05$) e diminuição de 41,21% quando comparado com o grupo TE ($p < 0,01$) em relação à expressão de P0. Na expressão de MBP ocorreu uma diminuição de 52,38% quando comparado com o grupo AE ($p > 0,05$) e diminuição de 23,08% quando comparado com o grupo TE ($p > 0,05$). Sobre a expressão de NF, houve um aumento de 3,89% em relação ao grupo AE ($p > 0,05$) e aumento de 2,66% com o grupo TE ($p > 0,05$).

Os gráficos obtidos após a análise das expressões com suas respectivas significâncias estão demonstrados na figura abaixo (Figura 8).

Figura 8. Padrões de expressão das proteínas P0 e MBP e expressão de NF.



Fonte: Elaborado pela autora. Padrões de expressão: proteína zero (P0), proteína básica de mielina (MBP) e neurofilamentos (NF). **(A)** Médias e desvio padrão da expressão da proteína P0 ($n=3$). $S \neq AE$; $TE \neq ATE$ ($p < 0,01$), $AE \neq TE$ ($p < 0,0001$) e $AE \neq ATE$ ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA One-Way seguida pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). **(B)** Médias e desvio padrão da expressão da proteína MBP ($n=3$). $TE \neq S$ ($p < 0,01$). Análise estatística: ANOVA One-Way seguida pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). **(C)** Médias e desvio padrão da expressão de NF ($n=3$). Não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$). Análise estatística: ANOVA One-Way seguida pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). **(D)** Micrografia de transmissão da distribuição de neurofilamentos. Barra: 1 nm.

5. DISCUSSÃO

A avaliação da alteração da morfologia nervosa frente a exercícios físicos é um ramo pouco explorado na ciência, e com o advento de treinos funcionais, a análise dessas mudanças se torna de suma importância, principalmente devido a existência de muita controvérsia decorrente da gama de protocolos disponíveis e também pela possibilidade de aplicação humana direta em exercícios funcionais, sobretudo com a união do alongamento com exercícios físicos. Entretanto, a maioria dos dados referente ao assunto na literatura são direcionados para a área de lesão nervosa, e com isso, esse estudo mostra a importância de se obter uma nova perspectiva, especialmente a qual demonstre a influência de tais protocolos na formação de adaptações na neuroanatomia periférica.

Foi observado que o grupo AE obteve diminuição na espessura da bainha de mielina e diminuição na expressão de P0 quando comparado com o grupo S. O'toole e Miller (2011), afirmam que o processo de alongamento auxilia no transporte de proteínas pelos axônios mediante a necessidade destas devido a diversos fatores, como por exemplo, mudanças no comprimento, calibre ou até mesmo na degradação de proteínas nos axônios. Entretanto, de acordo com a forma de realização do alongamento, a demanda por proteínas tende a diminuir, o que torna os axônios delgados. A compressão neural e consequente diminuição do aporte proteico foi observado na diminuição no número de neurofilamentos por área quando comparado com o grupo S, explicando de fato, a diminuição das demais estruturas associadas à diminuição das expressões das proteínas aqui analisadas. Uma vez intimamente associada à formação do envoltório de novas fibras nervosas e manutenção da integridade estrutural da bainha de mielina, a diminuição da expressão da proteína P0 também pode indicar o não aparecimento de novas fibras em decorrência da influência deletéria do processo de alongamento.

Entretanto, também foi observado a diminuição no diâmetro da fibra e axônio, bem como diminuição na área da bainha e na expressão de MBP quando comparado com o grupo S, o que demonstra que o alongamento possui influência sobre a morfologia de fibras nervosas ao reduzir o diâmetro das fibras existentes, mas com uma certa manutenção da funcionalidade do neurônio, uma vez que os valores de coeficiente G sofreram leve aumento em relação ao grupo S. Em decorrência disso, é esperado uma maior compactação das estruturas internas do axônio e com isso um valor maior de neurofilamentos por área, entretanto, somente sua expressão foi aumentada quando comparado com o grupo S. Endo e Nakayama (1993) observaram que, após o alongamento do nervo isquiático de ratos

promovido pelo alongamento utilizando um expensor de tecidos, houve uma diminuição da bainha de mielina e conservação dos elementos do citoesqueleto, ou seja, essa atividade a longo prazo induz mudanças nas fibras nervosas. Resultados semelhantes a respeito da manutenção dos microtúbulos e neurofilamentos foram observados por Pfister e colaboradores (2004) após o alongamento mecânico de neurônios de embriões *in vitro*. Segundo Yuan, Rao e Nixon (2017), a densidade de neurofilamentos em uma fibra nervosa não é regulada pela mielina, apesar de sofrerem influência dos sinais celulares de células sintetizantes de mielina, com isso, alterações na sua quantidade por área são resultado de mudanças de cunho estrutural.

Segundo Krause Neto e colaboradores (2015), foi visto que atividades físicas possuem a capacidade de aumentar a expressão de certas moléculas que estão intimamente ligadas a prática de exercícios, entretanto, foi observado o efeito oposto quanto ao alongamento, possivelmente indicando um efeito inibitório na expressão de certas proteínas, o que contribui com as evidências encontradas na literatura de um efeito maléfico dessa prática na geração de forças durante o exercício.

Apesar de observado uma diminuição das variáveis diâmetro da fibra, diâmetro do axônio, espessura e área da bainha quando comparado com S e AE, as maiores alterações decorrentes do exercício de escalada são expressas diretamente sobre a estrutura da bainha de mielina. Estudos que abordam somente a influência da atividade física sobre a morfologia nervosa são escassos, dessa forma, durante a avaliação da influência das diferentes intensidades de carga sobre a morfologia do nervo radial em ratos Wistar durante protocolo de escalada, Carbone et al. (2017) observaram um acréscimo de valor em todas as variáveis analisadas, indo contra nossos achados, possivelmente explicado pela diferença de localização dos nervos. Entretanto, a diminuição observada na espessura da bainha está diretamente atrelada à diminuição da expressão de MPB quando comparado com S e AE, uma vez que essa proteína é fundamental em processos de manutenção, regeneração e formação de novas bainhas envolvendo os nervos. Todavia, a expressão de P0 em comparação com os grupos S e AE aumentou, o que demonstra que a diminuição de MBP e da espessura da fibra podem estar relacionadas com o aparecimento de novas fibras nervosas, uma vez que P0 é a primeira proteína expressa durante a neoformação. Armada-da-silva et al. (2013) afirmam que a prática de exercícios de caminhada ou corrida em esteira em ratos que sofreram algum tipo de lesão nervosa aumenta o número de fibras nervosas mielinizadas e, em alguns casos, também auxilia na melhora a espessura da bainha de mielina dos nervos periféricos regenerados, e dessa forma corrobora com nossos resultados.

É visto que a atividade física possui capacidade de aumentar o número de neurônios no hipocampo de ratos adultos quando submetidos ao enriquecimento ambiental, e de certa forma, exerce papel protetor contra o processo de envelhecimento (KUHN; TODA; GAGE, 2018). Sakita e colaboradores (2018), relatam que ao analisar as fibras mielínicas de nervos periféricos em ratos Wistar idosos sob a influência de exercício aeróbico, ocorreu um aumento no diâmetro de fibra, diâmetro do axônio, espessura de mielina e perímetro de mielina, contradizendo nossos resultados, contudo, esses resultados podem ser explicados pela idade dos animais e pelo efeito conhecido do exercício em certa forma de reverter e prevenir o avanço de mudanças relacionadas à idade. Apesar disso, os autores relatam encontrar um aumento nos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no tecido nervoso. Sabe-se que imediatamente após a atividade física são liberados neurotrofinas que auxiliam no processo de manutenção da integridade das fibras nervosa ou mesmo no processo de regeneração em caso de lesão, com isso, BDNF e o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1) tornam-se importantes para a sobrevivência e diferenciação neuronal de células do sistema nervoso central (UYSAL et al., 2005; PARK; HÖKE, 2014). Outros estudos afirmam que a BDNF estimula a expressão de outras proteínas associadas à mielina, como por exemplo a P0, reforçando nossa hipótese de um aumento no número de fibras decorrente da atividade física (CHAN et al., 2001; ZHENG et al., 2016)

Em estudo realizados com ratos Wistar sobre a avaliação do treinamento de endurance na morfologia do nervo vago, Pianca e colaboradores (2015) demonstraram que o maior número de microtúbulos e neurofilamentos por área pode indicar um aumento de funcionalidade do nervo decorrente ao maior requerimento dessas estruturas, contribuindo em parte com os nossos resultados, uma vez que ocorre a diminuição do diâmetro das fibras e axônio e consequente concentração de neurofilamentos. Deschenes (2019) afirma que ocorre uma maior exigência por parte de neurônios motores submetidos a quaisquer tipo de treinamento, e assim o transporte de proteínas fica mais intenso, aumentando a atividade neuronal. A união dos dados apresentados confirmam a hipótese do surgimento de novas fibras principalmente quando unidos ao aumento de expressão de NF e de neurofilamentos por área quando comparado com os grupos S e AE, onde a compactação geral da fibra do grupo TE leva a uma maior densidade dessas estruturas, diferentemente do observado no alongamento, onde a forte conservação de neurofilamentos indica que, para a morfologia nervosa, o treinamento de escalada exige em maior grau das ultraestruturas nervosas. Atrelado a isso, as principais superfamílias de proteínas responsáveis pelo transporte lento de NFs são miosinas e actinas, componentes fundamentais das unidades funcionais dos músculos, e no

caso da actina, essa auxilia no processo de orientação da célula de Schwann durante a regeneração nervosa e posteriormente é parte integrante do mesaxônio, incisuras de Schmidt-Lantermann e regiões nodais, contribuindo para a manutenção da forma da bainha de mielina (JUNG et al., 2011). Yao e colaboradores (2006) sugerem que a expressão de subunidades de actina no interior da bainha de deve ao recrutamento destas por neurotrofinas expressas durante o processo de crescimento axonal, e assim, é possível que durante a prática de exercícios, as neurotrofinas expressas em resposta recrutem outros componentes que estimulam e auxiliam na neoformação de nervos.

Também em relação ao estudo de Sakita et al. (2018), foi observado uma correlação entre a diminuição do diâmetro das fibras com a diminuição do coeficiente G, mesmo que entre os grupos sedentário e treinado não tenha sido observada diferença significativa. Entretanto, esses resultados não corroboram com os nossos, onde o grupo TE apresentou aumento em relação ao grupo S e AE para a variável coeficiente G, o que demonstra existir talvez um efeito antagônico nas taxas que compõem essa medida, uma vez que ocorreram alterações opostas. Entretanto, Goulart e colaboradores (2014), demonstraram que durante o uso de células de schwann indiferenciadas combinada com a prática de exercício de esteira como forma de terapia no tratamento de lesão no nervo isquiático de camundongos C57Bl/6, os grupos que não praticaram exercícios apresentaram fibra com tamanho entre 0,4 a 0,6. Entretanto, os grupos que praticantes de exercício apresentaram maior número de fibras nervosas e com valor maior de coeficiente G, estando entre 0,5 a 0,8. Segundo os autores, esses valores são os mais adequados para o nervo isquiático. Este estudo corrobora com outros da literatura e com o intervalo de valores observado no presente estudo para todos os grupos analisados, onde os valores se mantiveram dentro do intervalo ideal para esse nervo (CHOMIAK, 2009; BONETTI et al., 2015; KRAUSE NETO et al., 2017).

Poucos estudos até o presente momento abordam alterações morfológicas de fibras nervosas decorrente da influência da prática combinada de alongamento com treinamento de escalada, dessa forma, esse estudo tem importante papel de elucidar as neuroadaptações frente a associação desses exercícios, principalmente de suma importância quanto a nortear futuros estudos da área, sobretudo os direcionados para a aplicação humana relacionada com treinos de cunho funcional.

Acredita-se que somente a prática de exercício seja insuficiente para tratamento de lesões, como por exemplo visto no tratamento de lesões em roedores, onde o estudo da prática combinada, seja com outros tipos de exercício ou mesmo com outras técnicas de tratamento como introdução de células de Schwann, propicia a liberação de uma gama maior de

neurotrofinas que auxiliam no processo regenerativo, e nesse contexto, o uso do treinamento associado de alongamento e exercício pode contribuir para uma regeneração mais eficaz (ENGLISH; WILHELM; SABATIER, 2011; GOULART et al., 2014; FU et al., 2016).

Foi visto que, para o grupo associado ATE, a diminuição significativa observada nas variáveis diâmetro da fibra e axônio, área e espessura da bainha de mielina, bem como do coeficiente G é válida somente para comparações com o grupo AE, enquanto que para o grupo TE ocorreu diminuição significativa somente nos diâmetros da fibra e axônio, área da bainha de mielina e coeficiente G. Isso demonstra que, quando comparado com o AL, o grupo ATE apresentou variáveis menores e significativas devido a ação inibitória do alongamento frente a formação de novas fibras nervosas, com isso, a execução do exercício físico no grupo associado anula em parte os efeitos do alongamento, como demonstrado nos valores de coeficiente G, onde os valores são menores do que AE devido a influência benéfica do exercício sobre a morfologia nervosa e muito menores do que TE devido a união das duas práticas, corroborando ainda mais com a neoformação. Como já relatado, a expressão de MBP está atrelada a mudanças na estrutura da bainha de mielina, onde ocorreu uma diminuição quando comparado com o grupo AE e TE, ambas coincidindo com a diminuição da espessura e área da bainha encontradas na comparação com AE e TE e corroborando com o surgimento de novas fibras nervosas neste grupo.

Com esse grau maior de compactação das fibras, é esperado uma maior densidade de neurofilamentos, com isso foi observado aumento no valor de neurofilamentos por área comparado o grupo associado com AE e TE, relacionado com a manutenção dos elementos estruturais axonais em decorrência do maior grau de exigência de transporte de proteínas devido a atividade física presente no grupo ATE. O aumento em relação ao grupo AE e TE em relação a expressão de NF também está relacionado com essa manutenção do citoesqueleto axonal para maximizar o transporte de proteínas e impulso, principalmente em decorrência do surgimento de novas fibras nervosas. Sabe-se que os neurofilamentos são componentes do citoesqueleto axonal e auxiliam na manutenção e crescimento do calibre neuronal, e dessa forma, colaboram com a sua integridade estrutural a fim de atingir velocidade de propagação ideal ao longo dos axônios (YUAN; RAO; NIXON, 2017; CAO et al., 2020). Outro fato que pode estar relacionado com a manutenção e aumento da expressão e densidade de neurofilamentos é a quantidade crescente de colágeno presente na periferia dos nervos. Conforme a intensidade e exigência do exercício foi se intensificando, um aumento não quantificado deste foi observado, o que pode ter relação com a ação da atividade física sobre os nervos. O colágeno faz parte integral da matriz extracelular, fornecendo suporte para

os demais componentes ali presentes. Com isso, Cao e colaboradores (2020) supõem que essa grande quantidade de colágeno, além de fornecer suporte estrutural para axônios mielinizados no hipocampo de ratos Sprague-Dawley idosos com disfunção cognitiva pós-operatória, ele também pode suprimir a degradação de neurofilamentos, protegendo a condução dos axônios e aumentando sua eficiência em casos de danos. Entretanto, Kerns (2008) relata que dependendo da forma como o alongamento é executado, diversas alterações são resultantes, dentre elas alterações no colágeno endoneurial. Dessa forma, esse parâmetro ainda necessita de mais investigações da sua influência sobre a morfologia nervosa, principalmente quanto a associação de alongamento com exercícios físicos.

É visto que, em um âmbito geral, as fibras que sofreram a influência dos dois tipos de exercício tiveram uma maior redução de seu tamanho com maior concentração dos componentes axonais, o que é demonstrado através da expressão levemente aumentada de NF em relação aos grupos AE e TE. A diminuição na expressão de P0 quando comparado com TE pode estar fortemente relacionada com a influência negativa do alongamento para a expressão de P0 no grupo associado, enquanto que o aumento quando comparado com AE pode estar relacionado a influência benéfica do exercício de escalada na morfologia nervosa, corroborando com a manutenção da compactação e neoformação de fibras nervosas do grupo correlacionado. Entretanto, a associação dos dois tipos de protocolo se mostra de certa forma benéfica, uma vez que ao se associarem, independente da influência aparentemente negativa do alongamento, o número de fibras nervosas tende a ser muito maior justamente pela tendência de neoformações nervosas que o exercício provoca. Kokkonen e colaboradores (2010) analisaram que o alongamento prévio ao treinamento de força atua como um estímulo adicional a um programa de treinamento de resistência, onde ao ser realizado 30 minutos de alongamento antes do exercício, ocasionou maiores ganhos de força quando comparado com o grupo apenas treinado, o que corrobora com nossos achados, uma vez que o grupo associado mostra melhores resultados quanto à formação de novas fibras nervosas com alterações nos componentes neuroestruturais e manutenção de um valor de coeficiente G, que corrobora com o encontrado na literatura. Além disso, essa maior quantidade de fibras pode estar associada com uma maior inervação muscular em decorrência da atividade física (DESCHENES et al., 1993; BOBINSKI et al., 2011; NISHIMUNE et al., 2014). Yuan, Rao e Nixon (2017) relatam que após o contato sináptico de axônios, sinais derivados de células da glia induzem estas a expandirem seu raio em até 10 vezes, com isso, o número de neurofilamentos aumenta em igual proporção, ocorrendo maior suporte e acréscimo da velocidade de condução para estas fibras maiores. Esses resultados corroboram em parte com nossos achados, uma vez que o

aumento da densidade de neurofilamentos muito provavelmente decorreu da redução do diâmetro axonal com consequente compactação destes.

Os efeitos de exercícios na morfologia nervosa ainda são pouco conhecidos e explorados devido a diversos fatores, principalmente em decorrência da diversidade de protocolos existentes que limitam um consenso geral sobre o assunto, bem como, na maioria dos casos, o uso de exercícios se dá como forma de tratamento em decorrência lesões. Nesse cenário, se faz necessário mais estudos que aprofundem e desenvolvam a temática, fornecendo embasamento para uma área ainda pouco explorada mas fundamental para o entendimento acerca de alterações morfológicas sem nervos.

6. CONCLUSÃO

O alongamento se mostra eficaz em promover alterações na morfologia nervosa ao diminuir o calibre axonal com manutenção da funcionalidade, onde sua influência além de demonstrar não ser tão eficaz para a neoformação de nervos, diminui a expressão de proteínas que auxiliam na formação de novas bainhas de mielina.

Por sua vez, o exercício se mostra mais efetivo, quando comparado com o alongamento, na promoção do surgimento de novas fibras nervosas, uma vez que essa atividade aumenta a expressão de proteínas intimamente associadas com a formação de novas bainhas. Além disso, tal atividade promove um aumento na atividade neuronal, o que dá suporte ao aparecimento de novas fibras, provavelmente pela alta demanda de componentes e exigência decorrente do exercício.

A prática combinada de exercícios se mostra muito mais benéfica para o indivíduo quando em comparação com o uso isolado. Assim, o grupo associado se mostra eficaz em promover o surgimento neuronal com manutenção de funcionalidade das fibras independente da ação do alongamento sobre a morfologia de fibras nervosas, principalmente por apresentarem o maior grau de redução de calibre e maior concentração de componentes axonais, o que mostra que a associação obteve maior beneficência comparado com os demais grupos para a morfologia e funcionalidade dos nervos periféricos de ratos.

Conclui-se, portanto, que todos os protocolos se mostraram eficazes em alterar a morfologia nervosa de acordo com suas especificidades, e que a associação de protocolos se mostra benéfica na promoção de novas fibras nervosas decorrente da interação dos protocolos.

REFERÊNCIAS

1. AGGARWAL, S.; SNAIDERO, N.; PÄHLER, G.; FREY, S.; SÁNCHEZ, P.; ZWECKSTETTER, M.; ... & GÖRLICH, D. Myelin membrane assembly is driven by a phase transition of myelin basic proteins into a cohesive protein meshwork. **PLoS Biology**, 11(6), e1001577, 2013.
2. ALENCAR, D., MELO, T. A., & MATIAS, K. F. D. S. Princípios fisiológicos do aquecimento e alongamento muscular na atividade esportiva. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 16(3), 230-234, 2010.
3. ALMEIDA, T. T. D., & JABUR, M. N. Mitos e verdades sobre flexibilidade: reflexões sobre o treinamento de flexibilidade na saúde dos seres humanos. **Motricidade**, 3(1), 337-344, 2007.
4. AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine and science in sports and exercise**, 41(3), 687, 2009.
5. ARMADA-DA-SILVA, P. A.; PEREIRA, C.; AMADO, S.; VELOSO, A. P. Role of physical exercise for improving posttraumatic nerve regeneration. **In International review of neurobiology** (Vol. 109, pp. 125-149). Academic Press. 2013.
6. AVELA, J.; KYROLAINEN, H.; KOMI, P. V. Altered reflex sensitivity after repeated and prolonged passive muscle stretching. **Journal of Applied Physiology**, 86(4), 1283-1291, 1999.
7. BARBOSA, G. K. et al. Structural and ultrastructural characteristics of the tongue of the Collared Peccary (Pecari tajacu, Linnaeus, 1758). **Anat Histol Embryol**. 00: 1– 9, 2020.
8. BEGA, A.; BOCALINI, D. S.; GAROTO, R. C.; DE LIMA MACIEL, C. C.; DA SILVA, A. A.; DE ANDRADE, N. S.; ALONSO, A. C.; CANONICA, A. C.; MAIFRINO, L. B. M.; GAMA, E. F.; DE SOUZA, R. R. Positive changes in femoral nerve morphometry in older rats following aerobic training. **Experimental gerontology**, 110, 92-97, 2018.
9. BERTOLINI, G. R. F., BARBIERI, C. H., & MAZZER, N. Análise longitudinal de músculos sóleos, de ratos, submetidos a alongamento passivo com uso prévio de ultrassom terapêutico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 15(2), 115-118, 2009.
10. BOBINSKI, F.; MARTINS, D. F.; BRATTI, T.; MAZZARDO-MARTINS, L.; WINKELMANN-DUARTE, E. C.; GUGLIELMO, L. G. A.; SANTOS, A. R. S. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337-348, 2011.
11. BONETTI, L. V.; SCHNEIDER, A. P. K.; BARBOSA, S.; ILHA, J.; FACCIONI-HEUSER, M. C. Balance and coordination training and endurance training after nerve injury. **Muscle & nerve**, 51(1), 83-91, 2015.

12. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254, 1976.
13. BRIANI, C.; ADAMI, F.; CARALLARO, T.; TAIOLI, F.; FERRARI, S.; FABRIZI, G. Axonal neuropathy due to myelin protein zero mutation misdiagnosed as amyloid neuropathy. **Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine**, 38(1), 921-923, 2008.
14. BUTLER, D. S. **Mobilização do sistema nervoso**. Barueri: Manole; 2003.
15. CAO, Y.; LIU, T.; LI, Z.; YANG, J.; MA, L.; QI, A.; WANG, A. Neurofilament degradation is involved in laparotomy-induced cognitive dysfunction in aged rats. **Research Square**. 2020.
16. CARBONE, P. O.; KRAUSE NETO, W.; GAMA, E. F.; SILVA, W. D. A.; NOBRE, T. L.; CAPERUTO, E. C.; MASCARO, M. B.; SOUZA, R. R. D. Morphological adjustments of the radial nerve are intensity-dependent. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 23(1), 55-59, 2017.
17. CHAN, J. R.; COSGAYA, J. M.; WU, Y. J.; SHOOTER, E. M. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98(25), 14661-14668, 2001.
18. CHOMIAK, Taylor; HU, Bin. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7754, 2009.
19. CIENA, A.P.; DE ALMEIDA S.R.; DIAS, F.J.; BOLINA, C.D.E.S; ISSA, J.P.; IYOMASA, M.M.; OGAWA, K.; WATANABE, I. S. Fine structure of myotendinous junction between the anterior belly of the digastric muscle and intermediate tendon in adults rats. **Micron**. n.43, p.258–262, 2012.
20. COBIANCHI, S.; CASALS-DIAZ, L.; JARAMILLO, J.; NAVARRO, X. Differential effects of activity dependent treatments on axonal regeneration and neuropathic pain after peripheral nerve injury. **Experimental neurology**, 240, 157-167, 2013.
21. CRAMER, J. T.; HOUSH, T. J.; JOHNSON, G. O.; MILLER, J. M.; COBURN, J. W.; BECK, T. W. Acute effects of static stretching on peak torque in women. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, 18(2), 236-241, 2004.
22. DA SILVA, J. T.; SANTOS, F. M. D.; GIARDINI, A. C.; MARTINS, D. D. O.; DE OLIVEIRA, M. E.; CIENA, A. P.; ... & CHACUR, M. Neural mobilization promotes nerve regeneration by nerve growth factor and myelin protein zero increased after sciatic nerve injury. **Growth Factors**, 33(1), 8-13, 2015.
23. DESCHENES, M. R. Adaptations of the neuromuscular junction to exercise training. **Current Opinion in Physiology**, 10, 10-16, 2019.
24. DESCHENES, M. R.; MARESH, C. M.; CRIVELLO, J. F.; ARMSTRONG, L. E.; KRAEMER, W. J.; COVAULT, J. The effects of exercise training of different intensities

on neuromuscular junction morphology. **Journal of neurocytology**, 22(8), 603-615, 1993.

25. DIKRANIAN, K. **The amazing brain**. 2015.
26. ENDO, T.; NAKAYAMA, Y. Histologic examination of peripheral nerves elongated by tissue expanders. **British journal of plastic surgery**, 46(5), 421-425, 1993.
27. ENGLISH, A. W.; WILHELM, J. C.; SABATIER, M. J. Enhancing recovery from peripheral nerve injury using treadmill training. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, 193(4), 354-361, 2011.
28. FEITO, Y.; BROWN, C.; OLMOS, A. A content analysis of the High-Intensity Functional Training Literature: a look at the past and directions for the future. **Human Movement**, 20(2), 1-15, 2019.
29. FU, J., WANG, H., DENG, L., & LI, J. Exercise training promotes functional recovery after spinal cord injury. **Neural plasticity**, 2016.
30. GABRIEL, D. A.; KAMEN, G.; FROST, G. Neural adaptations to resistive exercise. **Sports Medicine**, 36(2), 133-149, 2006.
31. GIANELO, M. C. S. et al. Three days of intermittent stretching after muscle disuse alters the proteins involved in force transmission in muscle fibers in weanling rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 49(2), 2016.
32. GOODWIN, J. E.; GLAISTER, M.; LOCKEY, R. A.; BUXTON, E. The effects of acute static and dynamic stretching on spring-mass leg stiffness. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, 24(1), 281-288, 2020.
33. GOULART, C. O.; JÜRGENSEN, S.; SOUTO, A.; OLIVEIRA, J. T.; DE LIMA, S.; TONDA-TURO, C.; MARQUES, S. A.; ALMEIDA, F. M. D.; MARTINEZ, A. M. B. A combination of Schwann-cell grafts and aerobic exercise enhances sciatic nerve regeneration. **PloS one**, 9(10), 2014.
34. GRAVES, J. E.; FRANKLIN, B. A. **Resistance training for health and rehabilitation**. Human Kinetics, 2001.
35. GUEDERT, D. G. **Avaliação das repercussões do exercício físico sobre a regeneração nervosa de ratos Wistar submetidos a axonotmese do nervo isquiático**. 117 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)-Universidade Federal de Santa Catarina. 2014.
36. GUISSARD, N.; DUCHATEAU, J. Effect of static stretch training on neural and mechanical properties of the human plantar-flexor muscles. **Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine**, 29(2), 248-255, 2004.

37. GUISSARD, N.; DUCHATEAU, J.; HAINAUT, K. Mechanisms of decreased motoneurone excitation during passive muscle stretching. **Experimental Brain Research**, 137(2), 163-169, 2001.
38. HORNBERGER JR, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian journal of applied physiology**, 29(1), 16-31, 2004.
39. ILHA, J.; ARAUJO, R. T.; MALYSZ, T.; HERMEL, E. E.; RIGON, P.; XAVIER, L. L.; ACHAVALL, M. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabilitation and neural repair**, 22(4), 355-366, 2008.
40. JACOB, C. S. et al. Effects of physical training on sarcomere lengths and muscle-tendon interface of the cervical region in an experimental model of menopause. **European journal of histochemistry: EJH**, 63(3), 2019.
41. JANG, S. W.; SVAREN, J. Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenic elements. **Journal of Biological Chemistry**, 284(30), 20111-20120, 2009.
42. JUNG, J.; CAI, W.; LEE, H. K.; PELLEGATTA, M.; SHIN, Y. K.; JANG, S. Y.; PARK, H. T. Actin polymerization is essential for myelin sheath fragmentation during Wallerian degeneration. **Journal of Neuroscience**, 31(6), 2009-2015, 2011.
43. KAMIJO, A.; SAITOH, Y.; OHNO, N.; OHNO, S.; TERADA, N. Immunohistochemical study of mouse sciatic nerves under various stretching conditions with “in vivo cryotechnique”. **Journal of neuroscience methods**, 227, 181-188, 2014.
44. KERNS, J. M. The microstructure of peripheral nerves. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, 12(3), 127-133, 2008.
45. KOKKONEN, J.; NELSON, A. G.; TARAWHITI, T.; BUCKINGHAM, P.; WINCHESTER, J. B. Early-phase resistance training strength gains in novice lifters are enhanced by doing static stretching. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, 24(2), 502-506, 2010.
46. KRAUSE NETO, W.; SILVA, W. D. A.; CIENA, A. P.; ANARUMA, C. A.; GAMA, E. F. Vertical climbing for rodent resistance training: a discussion about training parameters. **International Journal of Sports Science**, 6, 36-49, 2016.
47. KRAUSE NETO, W.; CIENA, A. P.; ANARUMA, C. A.; DE SOUZA, R. R.; GAMA, E. F. Effects of exercise on neuromuscular junction components across age: systematic review of animal experimental studies. **BMC research notes**, 8(1), 713, 2015.
48. KRAUSE NETO, W.; SILVA, W. D. A.; CIENA, A. P.; DE SOUZA, R. R.; ANARUMA, C. A.; & GAMA, E. F. Aging induces changes in the somatic nerve and postsynaptic component without any alterations in skeletal muscles morphology and capacity to carry load of Wistar rats. **Frontiers in neuroscience**, 11, 688, 2017.

49. KUHN, H. G.; TODA, T.; GAGE, F. H. **Adult hippocampal neurogenesis: a coming-of-age story.** *Journal of Neuroscience*, 38(49), 10401-10410, 2018.
50. LARSON, C. E., & MENG, E. A review for the peripheral nerve interface designer. **Journal of neuroscience methods**, 332, 108523, 2020.
51. LEE, D. R.; RHEE, M. H.; EOM, J. R.; KIM, J. S. Changes in Nerve Excitability During Neural Stretching. **PNF and Movement**, 16(2), 287-294, 2018.
52. MAREK, S. M.; CRAMER, J. T.; FINCHER, A. L.; MASSEY, L. L.; DANGELMAIER, S. M.; PURKAYASTHA, S.; FITZ, K. A.; CULBERTSON, J. Y. Acute effects of static and proprioceptive neuromuscular facilitation stretching on muscle strength and power output. **Journal of athletic training**, 40(2), 94, 2005.
53. MARTINI, R. et al. Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. **Journal of Neuroscience**, 15(6), 4488-4495, 1995.
54. MCWEENY, D. K.; BOULE, N. G.; NETO, J. H. F.; KENNEDY, M. D. Effect of high intensity functional training and traditional resistance training on aerobic, anaerobic, and musculoskeletal fitness improvement. **Journal of Physical Education and Sport**, 20(4), 1791-1802, 2020.
55. NAGHIBZADEH, M. et al. Comparison of high-intensity interval versus low-intensity continuous training for myelin synthesis related genes in C57BL/6 mice. **Journal of Basic Research in Medical Sciences**, 5(3), 42-48, 2018.
56. NISHIMUNE, H.; STANFORD, J. A.; MORI, Y. Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction. **Muscle & nerve**, 49(3), 315-324, 2014.
57. NOÓBREGA, A. C.; PAULA, K. C.; CARVALHO, A. C. G. Interaction between resistance training and flexibility training in healthy young adults. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, 19(4), 842-846, 2005.
58. NUNES J.P.; SCHOENFELD B.J.; NAKAMURA M.; RIBEIRO A.S.; CUNHA P.M.; CYRINO E.S.; Does stretch training induce muscle hypertrophy in humans? A review of the literature. **Clinical Physiology and Functional Imaging**. 40(3):148-156, 2020.
59. O'TOOLE, M., & MILLER, K. E. The role of stretching in slow axonal transport. **Biophysical journal**, 100(2), 351-360, 2011.
60. PARK, J. S.; HÖKE, A. Treadmill exercise induced functional recovery after peripheral nerve repair is associated with increased levels of neurotrophic factors. **PloS one**, 9(3), 2014.
61. PERETTI, A. L.; ANTUNES, J. S.; LOVISON, K.; KARVAT, J.; HIGUCHI, G.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BERTOLINI, G. R. F.; RIBEIRO, L. D. F. C. Ação do exercício de subida em escada com sobrecarga na morfologia do músculo tibial anterior de ratos Wistars após axonotmese. **ConScientiae Saúde**, 16(1), 33-41, 2017.

62. PFISTER, B. J.; IWATA, A.; MEANEY, D. F.; SMITH, D. H. Extreme stretch growth of integrated axons. **Journal of Neuroscience**, 24(36), 7978-7983, 2004.
63. PIANCA, E.; KRAUSE NETO, W.; PITHON-CURI, T. C.; GAMA, E. F.; SABBAG, A.; SOUZA, R. R. D. Endurance training induces structural and morphoquantitative changes in rat vagus nerve. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 21(5), 403- 406, 2015.
64. RAASAKKA, A.; RUSKAMO, S.; KOWAL, J.; HAN, H.; BAUMANN, A.; MYLLYKOSKI, M.; ULRICH, A. S. Molecular structure and function of myelin protein P0 in membrane stacking. **Scientific reports**, 9(1), 1-15, 2019.
65. RAMOS, G. V.; SANTOS, R. R. D.; GONÇALVES, A. Influência do alongamento sobre a força muscular: uma breve revisão sobre as possíveis causas. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, 9(2), 203-6, 2007.
66. RUSHTON, W. A. H. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. **The Journal of physiology**, 115(1), 101-122, 1951.
67. SAHAR, M. S. U.; METTYAS, T.; BARTON, M. Development of a nerve stretcher for in vivo stretching of nerve fibres. **Biomedical Physics & Engineering Express**, 5(4), 045026, 2019.
68. SAKITA, M.; MURAKAMI, S.; NONAKA, K.; SAKAMOTO, R.; SAITO, T.; ISOBE, W.; KUMAGAI, S. Different patterns in age-related morphometric alteration of myelinated fibers and capillaries of the tibial nerve: a longitudinal study in normal rats. **Journal of Anatomy**, 236(6), 1101-1111, 2020.
69. SCHWEITZER, J.; BECKER, T.; BECKER, C. G.; SCHACHNER, M. Expression of protein zero is increased in lesioned axon pathways in the central nervous system of adult zebrafish. **Glia**, 41(3), 301-317, 2013.
70. SEO, D. Y.; LEE, S. R.; KIM, N.; KO, K. S.; RHEE, B. D.; HAN, J. Humanized animal exercise model for clinical implication. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, 466(9), 1673-1687, 2014.
71. SIERRA, L. R. et al. Myotendinous junction plasticity in aged ovariectomized rats submitted to aquatic training. **Microscopy Research and Technique**, 81(8), 816-822, 2018.
72. SOLBERG, P. A.; KVAMME, N. H.; RAASTAD, T.; OMMUNDSEN, Y.; TOMTEN, S. E.; HALVARI, H.; HALLÉN, J. Effects of different types of exercise on muscle mass, strength, function and well-being in elderly. **European Journal of Sport Science**, 13(1), 112-125, 2013.
73. SOUZA, S. C. D. **Lições de anatomia: manual de esplancnologia**, 2010.
74. STANDRING, S. (Ed.). **Gray's anatomia: a base anatômica da prática clínica**. 40. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

75. SUNDERLAND, S. S. The anatomy and physiology of nerve injury. **Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine**, 13(9), 771-784, 1990.
76. TALAMONI, A. C. B. **No anfiteatro da anatomia: o cadáver e a morte**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. (Coleção PROPG Digital - UNESP). ISBN 9788579833502. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/109231>>.
77. TARI, A. R.; NOREVIK, C. S.; SCRIMGEOUR, N. R.; KOBRO-FLATMOEN, A.; STORM-MATHISEN, J.; BERGERSEN, L. H.; WISLØFF, U. Are the neuroprotective effects of exercise training systemically mediated?. **Progress in cardiovascular diseases**, 62(2), 94-101, 2019.
78. TEODORI, R. M.; BETINI, J.; DE OLIVEIRA, L. S.; SOBRAL, L. L.; TAKEDA, S. Y. M.; MONTEBELO, M. I. D. L. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. **Neural plasticity**, 2011.
79. TSUGE, H. A myelin sheath protein forming its lattice. **Journal of Biological Chemistry**, 295(26), 8706-8707, 2020.
80. UYSAL, N.; TUGYAN, K.; KAYATEKIN, B. M.; ACIKGOZ, O.; BAGRIYANIK, H. A.; GONENC, S.; SEMIN, I. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. **Neuroscience letters**, 383(3), 241-245, 2005.
81. VAN DE GRAAFF, K. M. **Anatomia humana**. 6o ed. Barueri: Manole, 2003.
82. WALL, E. J.; MASSIE, J. B.; KWAN, M. K.; RYDEVIK, B. L.; MYERS, R. R.; GARFIN, S. R. Experimental stretch neuropathy. Changes in nerve conduction under tension. **The Journal of bone and joint surgery**. British volume, 74(1), 126-129, 1992.
83. WATANABE, I. S.; YAMADA, E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingiva. **Archivum histologicum japonicum**, 46(2), 173-182, 1983.
84. WEISS, T.; KREITINGER, J.; WILDE, H.; WIORA, C.; STEEGE, M.; DALLECK, L.; JANOT, J. Effect of functional resistance training on muscular fitness outcomes in young adults. **Journal of Exercise Science & Fitness**, 8(2), 113-122, 2010.
85. WEHRWEIN, E. A.; ROSKELLEY, E. M.; SPITSBERGEN, J. M. GDNF is regulated in an activity-dependent manner in rat skeletal muscle. **Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine**, 26(2), 206-211, 2002.
86. WHITEHEAD, T. J. An Enhanced Nerve Conduit Combined With Exercise To Improve Functional Recovery After Peripheral Nerve Injury. **Wayne State University Dissertations**. 2017.
87. WRIGHT, T. W.; GLOWCZEWSKIE JR, F.; COWIN, D.; WHEELER, D. L. Radial nerve excursion and strain at the elbow and wrist associated with upper-extremity motion. **The Journal of hand surgery**, 30(5), 990-996, 2005.

88. YAO, J.; SASAKI, Y.; WEN, Z.; BASSELL, G. J.; ZHENG, J. Q. An essential role for β -actin mRNA localization and translation in Ca^{2+} -dependent growth cone guidance. **Nature neuroscience**, 9(10), 1265-1273, 2006.
89. YUAN, A.; RAO, M. V.; NIXON, R. A. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 9(4), a018309, 2017.
90. ZHENG, J.; SUN, J.; LU, X.; ZHAO, P.; LI, K.; LI, L. BDNF promotes the axonal regrowth after sciatic nerve crush through intrinsic neuronal capability upregulation and distal portion protection. **Neuroscience letters**, 621, 1-8, 2016.

ANEXO A - PARECER COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA – IB – UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 08/2020

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 13/09/2019	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "MODULAÇÕES MORFOMÉTRICAS DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS WISTAR ADULTOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE ALONGAMENTO ESTÁTICO E TREINAMENTO DE ESCALADA", protocolo nº 5552 sob responsabilidade de Adriano Polican Ciena (Pesquisador Responsável) e Mariana Pasquini Rodrigues (orientanda), que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==.==	
Colaboradores:	
A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro,	
(x)	Aprovou "ad referendum" a alteração do Projeto de Pesquisa acima citado (número de animais)
()	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
()	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Aprovou RETORNAR ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
()	Não Aprovou.
()	Retirou , devido à permanência das pendências.
Vigência da autorização: 01/08/19 a 31/07/20	
Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica	
Espécie/linhagem/raça: <i>rattus norvegicus</i> (ratos wistar)	
Número de animais: 24 (anteriormente aprovado – 18) Peso: 300g - Idade: 90 dias Sexo: macho	
Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Biotério Central do Câmpus de Botucatu - UNESP	
Objetivo Acadêmico:	☐ TCC ☐ Mestrado ☐ Doutorado ☒ Outros – (Iniciação Científica) ☐ Pós- Graduação

Rio Claro, 24/09/2020

Marco A. Pizo
Prof. Dr. Marco Aurélio Pizo Ferreira
Coordenador



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro
Departamento de Educação Física



Prezado Senhor
Prof. Dr. Marco Aurelio Pizo Ferreira
Coordenador – CEUA - IB

Venho através deste, solicitar alteração do número de animais de 18 para 24, referente ao Projeto de Pesquisa: "Modulações morfométricas do nervo isquiático de ratos Wistar adultos submetidos ao protocolo experimental de alongamento estático e treinamento de escalada", decisão CEUA 28/2019. Por proporcionar recomendado delineamento nas análises e tratamentos estatísticos das variáveis investigadas neste estudo.

Atenciosamente.

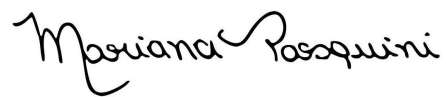
Rio Claro, 14 de Setembro de 2020.

Prof. Dr. Adriano Polican Ciena
Coordenador do Laboratório de Morfologia e Atividade Física – "LAMAF"



Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

Orientador



Mariana Pasquini Rodrigues

Orientanda

Rio Claro

2021