UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

**A REINERVAÇÃO DO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS
DEDOS (EDL) DE RATOS (*Rattus norvegicus*) SERIA
INFLUENCIADA PELO USO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA E
DO TECIDO ADIPOSEO NA TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO?**

LUIS HENRIQUE RAPUCCI MORAES

BAURU 2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

**A REINERVAÇÃO DO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS (EDL) DE
RATOS (Rattus norvegicus) SERIA INFLUENCIADA PELO USO DO LASER DE
BAIXA POTÊNCIA E DO TECIDO ADIPOSEO NA TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO?**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
mestre em Odontologia.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

BAURU 2009

M791r Moraes, Luis Henrique Rapucci

A reinervação do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos (rattus norvegicus) seria influenciada pelo uso do laser de baixa potência e do tecido adiposo na técnica de tubulização? / Luis Henrique Rapucci Moraes. – Bauru, 2009. 91p.: il.; 30cm.

Tese. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado em 17 de setembro de 2007 pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP..

Protocolo nº 19/2007

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. N° 19/2007

Bauru 17 de setembro de 2007.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“Interação mioneural: aspectos degenerativos e regenerativos”**, de sua autoria foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito em reunião desta Comissão realizada no dia 13 de setembro de 2007.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Of. CEEPA-FOB/USP Nº 02/2009

Proc. Nº 019/2007

Bauru, 27 de fevereiro de 2009.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para desmembramento do projeto de pesquisa **"Interação Mioneural: aspectos degenerativos e regenerativos"**, de sua autoria, aprovou-se *ad referendum*, o que segue:

"O tecido adiposo usado na técnica de tubulização teria influência na reinervação de músculos de contração rápida de ratos?", de autoria de **Luiz Henrique Rapucci Moraes**;

"Enxerto nervoso preenchido com gordura no reparo de nervo periférico: uma nova proposta", de autoria de **Geraldo Marco Rosa Júnior**;

"Expressão e localização de fatores de regulação miogênica (Myod e Miogenina) em músculos somáticos de ratos reinervados pela técnica de tubulização", de autoria de **Erivan Schneider Ramos Júnior**.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Osvaldo e Creusa, e aos meus irmãos Luis Gustavo e Luis Eduardo, pelo apoio e incentivo, acompanhando-me até aqui.

Aos meus padrinhos Samir e Penha, por acenderem as luzes de meu caminho, sempre.

À minha noiva Fernanda, pelos sucessivos incentivos e motivações.

Às minhas avós Maria e Eugênia (*in memoriam*) pelo amor e preocupação, cujo apoio e carinho sempre foram fundamentais.

Vocês são muito importantes em tudo o que faço e meu amor por vocês é imenso!

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Jesus Carlos Andreo, pelos anos de parceria, trabalho e paciência, pelo profissionalismo e humildade, digno de uma pessoa sábia; por colaborar para meu crescimento e aprendizado profissional, e pela amizade de tamanha gratidão, vinda de gerações.

Ao prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues, pelos anos de ensinamentos que pode me oferecer, tanto cientificamente quanto pessoal, pela sua amizade e companheirismo, sua participação teve total importância para o desenvolvimento desse projeto e outros que virão.

Ao amigo e companheiro de mestrado, Geraldo Marco Rosa Junior, pela tamanha colaboração nesses anos de estudo e realização deste projeto, horas e horas de trabalho.

Ao mestrando Daniel Ventura Dias, às estagiarias, Letícia, Melina e Tatiane, pelo imenso apoio e colaboração para a realização deste projeto.

Aos funcionários e ao professor chefe do laboratório de Anatomia da FOB, Romário, Orivaldo, Cisira e prof. Dr. João Lopes de Toledo Filho. Obrigado pelo apoio, compreensão, e horas de conversa.

Aos meus colegas de mestrado da Biologia Oral, Aline, Mileni, Carlos Eduardo e Erivan, pela contribuição de grande valia neste projeto.

À Tânia e à Daniella do laboratório de Histologia, aos técnicos Ovídio e Telma do laboratório de Bioquímica

À todos que me ajudaram do Laboratório de Patologia, às Dra. Melaine, e Patrícia, aos Doutorandos Karine, Carol, Aroldo (*in memorian*), à técnica Fatiminha e à secretária Cris. Agradeço de coração a ajuda que me deram neste período.

Aos professores Doutores, Rodrigo Cardoso da Bioquímica, ao prof. Luis Taveira e Vanessa, da Patologia, prof. Carlos do Lab. de Farmacologia, por abrirem as portas de seus laboratórios para o desenvolvimento prático deste trabalho.

À Márcia, pela colaboração e paciência das fotomicrografias no microscópio confocal das lâminas de Imunofluorescência. Obrigado!

Às secretárias da Pós Graduação, em especial à Graciane. Obrigado por suas assistências nestes anos.

Ao professor Doutor Lauris pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos amigos, que mesmo perguntando milhares de vezes, sempre tiveram ouvidos para escutar o que eu pesquisava nesses dois anos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha pesquisa e meu crescimento durante estes anos de trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1- Rede regulatória da diferenciação muscular.....	29
Figura 2- Assepsia do pescoço do rato, retirada da veia jugular externa, e a veia extraída e mantida em meio de solução fisiológica no fio ortodôntico inoxidável de 0,06mm.	44
Figura 3- Assepsia da coxa direita do rato, exposição do nervo ciático, e tubulização por meio de enxerto venoso.....	45
Figura 4- Aparelho de laser-terapia de baixa potência, canaleta utilizada na análise da marcha dos ratos e impressões das patas do membro posterior para avaliação.....	46
Figura 5- Congelamento dos fragmentos musculares utilizando blister, fotomicroscópio e monitores para análise de imagens e morfometria.....	48
Figura 6- Resultado das amostras do músculo EDL submetidas a reações histoenzimológicas m-ATPase ácido, pH4.55 e pH 4.35; m-ATPase Alcalina pH 10.4; e reação NADH-Tr	52
Figura 7- Fotomicrografia das fibras musculares do musculo EDL do grupo GCN150, submetidas à reações de mATPase alcalina pH 10,5 e mATPase acida pH 4,35.	53
Figura 8- Fotomicrografia de reação mATPase pH4,55 evidenciando grupos de fibras de mesmo perfil fenotípico.	58
Figura 9- Fotomicrografia dos músculos EDL corados em HE dos grupos desta pesquisa.....	60
Figura 10- Fotomicrografia de Imunofluorescência mostrando a localização de Myod e núcleos	62
Figura 11- Fotomicrografia de Imunofluorescência mostrando a localização de Miogenina e núcleos	62

Figura 12- Fotomicrografia das reações Imunohistoquímica para marcação de células em apoptose63

Figura 13- Membro em que foi submetido a cirurgia, relatando autofagia de suas falanges66

- QUADROS

Quadro 1- Resultados das reações de m-ATPase e NADH-Tr a que foram submetidas às amostras do músculo EDL de rato (*Rattus norvegicus*).53

Quadro 2- Resultado da morfometria (mm²) do tecido muscular submetido à Imunohistoquímica de Tunel, verificando a quantidade de marcação de apoptose encontrada nesses tecidos.....63

Quadro 3 - Pesos médios, iniciais e finais, em gramas (g) e ganhos de peso em %, dos animais de todos os grupos usados no trabalho.65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Área média (em μm^2), desvio padrão (S.D.) e percentagem dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo EDL dos grupos estudados	54
Tabela 2- Área média (em μm^2), desvio padrão (S.D.) e percentagem dos diferentes tipos de fibras encontrados no músculo EDL dos animais dos Grupos Controles positivos e negativos	54
Tabela 3- Área média (em μm^2), desvio padrão (S.D.) e percentagem dos diferentes tipos de fibras encontrados no músculo EDL dos animais dos Grupos de período 45 dias	55
Tabela 4- Área média (em μm^2), desvio padrão (S.D.) e percentagem dos diferentes tipos de fibras encontrados no músculo EDL dos animais dos Grupos de período 150 dias	55
Tabela5- Área média (em μm^2) e percentagem dos diferentes tipos de fibras encontrados no músculo EDL dos animais dos Grupos 45 e 150 dias.....	56
Tabela 6- Média da área das fibras (μm^2), percentagem da área e perda total dos diferentes tipos de fibras encontrada nos grupos	57
Tabela 7- Análise funcional do nervo ciático, utilizando a equação de BAIN et al.,(1989), postas em ordem decrescente	64

RESUMO

Lesões nervosas periféricas com alterações morfofuncionais são de grande importância clínica, porque pode prejudicar a função, comprometendo a sensibilidade e/ou a motricidade do órgão alvo. Quando o nervo é lesado, o indivíduo torna-se impossibilitado de realizar suas atividades, seja profissional ou pessoal, e a partir do acidente esta situação se agrava ainda mais, pois tem início uma trajetória de sofrimento e humilhações decorrentes do tipo de assistência que passa a receber, tendo em vista, ainda, a fragilidade emocional e o abatimento moral de quem passa a ser vítima. Na tentativa de reparo de lesões graves de nervos periféricos, várias técnicas têm sido utilizadas, mas algumas com prejuízos funcionais para outras áreas do corpo, como por exemplo, quando se usa outro nervo no enxerto. Considerando que enxertos venosos têm tido bons resultados na capacidade regenerativa das fibras nervosas, e como elas são encontradas em abundância e em locais de fácil acesso cirúrgico, pensou-se em verificar se o tecido adiposo e o laser de baixa potência alterariam os resultados da reinervação, por tubulização, em músculos de contração rápida (EDL). Para isso foi utilizado 84 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem wistar, machos, que foram divididos em 12 grupos (oito experimentais e quatro controles). Nos grupos experimentais (GE) foi utilizada tubulização de veia preenchida, ou não de tecido adiposo (GEVV e GEVG, respectivamente), com e sem tratamento de laser (GEVVL e GEVGL, respectivamente). Os grupos controles (GC) receberam os nomes de positivos (GCP) quando os animais não sofreram intervenção cirúrgica, e negativos (GCN) quando os animais foram submetidos à desnervação do nervo ciático. Todos os grupos tiveram os seus animais sacrificados em dois períodos, 45 e 150 dias, após o início do experimento. A certificação da recuperação foi feita por meio da análise dos músculos inervados por ele (EDL), comparando-os com os respectivos grupos controles. Técnicas de microscopia, Imunofluorescência (MyoD e miogenina), apoptose (Tunel), morfométricas e análise funcional do ciático, foram empregadas nesta investigação. Os resultados mostraram que aos 45 dias pós desnervação os dados dos grupos experimentais estavam mais próximos do grupo controle negativo, mas aos 150 dias eles estavam mais próximos aos do grupo controle positivo.

Baseado nos dados obtidos pode-se concluir que o uso de tecido adiposo e do laser de baixa potência na técnica de tubulização do nervo ciático interferem na recuperação do músculo EDL desnervado.

Palavra chave: Técnica de tubulização, músculo Extensor Longo dos Dedos, m-ATPase, Myod, Miogenina, Apoptose Análise Funcional do Ciático.

ABSTRACT

The reinnervation of *extensor digitorius longus* (EDL) of rats (*Rattus norvegicus*), would be influenced by the association of adipose tissue and low power laser in tubulization technique by vein?

The peripheral nerves injuries with morphofunctional alterations, have great clinical importance because could prejudice the function, committing the sensibility and/or the motricity of target organ. When nerve is damage, the individual becomes disabled to realize yours activities, either professional or personal, in the post accident periods, this situation aggravates each more, therefore initiate a trajectory of suffering and distressing despite of the kind of assistance that this person receives, in view of your emotional fragility and your moral discouragement that pass to be victim. In attempt to repair severe peripheral nerves lesions, many techniques had been used, but some present functional prejudices to other area of bodies, for example when other autologous nerve graft it is used. Considering that, vein graft had demonstrated good results in regenerative nerve fibers capacity, and the vein are found in abundance in many locals of chirurgic access, it thought in verify if the adipose tissue and low power laser could alter the reinnervation results, by tubulization technique, in fast twitch muscle (EDL). For this, was used 84 rats (*Rattus norvegicus*) wistar, male, divided in 12 groups (eight experimental and four controls). In the experimental groups (EG) was used tubulization by vein combined / or not with adipose tissue (EGV and EGVA, receptively), with or without laser treatment (EGVL and EGVAL, respectively). The controls groups (CG) was called of positives (CGP) when the animals did not subject to transaction nerve, and negatives (CGN) when the sciatic nerve was transaction in this animals. All groups had the animals scarified in two periods, 45 and 150 days post experiments beginning. The recuperation was notified by means of muscle innervated analysis (EDL), comparing with the respective controls groups. Microscope techniques, Immunofluorescence for (MyoD and Miogenin), apoptosis by (Tunel assay), morphometrics and sciatic functional analysis, were employed in this investigation. The results showed that in the 45 days post-denervation, the data of experimental groups was nearest of negative control

group (transaction sciatic nerve), but in the 150 days they was nearest to the positive control group. Based on this, could be conclude that the use of adipose tissue and low power laser used in the tubulization technique by vein in the sciatic nerve interfere in the recuperation of EDL muscle dennervated.

Key Words: Tubulization techniques, muscle extensor digitorius longus, m-ATPase, MyoD, Miogenin, Apoptosis, Sciatic Functional Analysis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
O MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.....	22
A1- Músculo Estriado Esquelético Desnervado.....	22
A2- Tipos De Fibras Em Músculo Estriado Esquelético.....	24
A3- Células Satélites (Cs).....	27
APOPTOSE	29
LESÃO E RECUPERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO.....	31
O TECIDO ADIPOSEO.....	33
O LASER.....	34
ANÁLISE FUNCIONAL DE NERVOS PERIFÉRICOS.....	38
MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
Animais de experimentação	42
Protocolo cirúrgico	43
Anestesia e assepsia dos animais	43
Retirada da veia jugular externa.....	44
Secção do nervo ciático	45
Aplicação do Laser	45
Avaliação Funcional do nervo ciático -.....	46
Coleta de amostras e criopreservação -	47
Histoquímica para m-ATPase e NADH -	47
Processamento para análise morfométrica -.....	48
Imunofluorescência -	48
Processamento Imuohistoquímico para detecção de Apoptose-	49
Tratamento Estatístico -	50
RESULTADOS	51
mATPase e HE do músculo EDL	52
Localização dos fatores de regulação miogênica MyoD e Miogenina por	
Imunofluorescência.....	61
Marcação de células apoptóticas.....	63
Análise Funcional do Ciático.....	64

Peso dos animais.....	65
DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

INTRODUÇÃO

Lesões nervosas periféricas com alterações morfofuncionais são de grande importância clínica, porque pode prejudicar a função, comprometendo a sensibilidade e/ou a motricidade. Inúmeros pesquisadores têm voltado suas atenções na busca de soluções para o reparo de nervos periféricos lesados, sendo testadas várias técnicas para tal recuperação.

Quando o nervo é lesado, o indivíduo torna-se impossibilitado de realizar suas atividades, sejam profissionais ou pessoais (LECH, 1990). As seqüelas funcionais decorrentes destes traumas podem ser diretas e indiretas e são representadas pelos distúrbios de sensibilidade, dos movimentos articulares, dos desvios segmentares e associação de lesões (PERNET, 1977).

"O acidente consiste no início de uma longa trajetória marcada, fundamentalmente, pelo desrespeito aos direitos mínimos de cidadania" (COHN et al. 1985). ... "a partir do acidente esta situação se agrava ainda mais, pois tem início uma trajetória de sofrimento e humilhações decorrentes do tipo de assistência que passa a receber, tendo em vista, ainda, a fragilidade emocional e o abatimento moral de que passa a ser vítima ..." (MINELLA, 1993).

Os acidentes de trabalho onde ocorrem lesões nervosas continuam sendo um problema grave e freqüente, provocando perturbações funcionais que causam perda ou redução permanente ou temporária da capacidade para o trabalho (MACKIN e BYRON, 1990).

As cirurgias para reparação das lesões dos nervos, inicialmente eram feitas apenas quando o segmento nervoso lesado era de pequena extensão, e nesse caso eram unidos os cotos nervosos e eram chamadas de neurorrafia, nome que permanece até hoje.

A primeira neurorrafia foi realizada por William de Saliceto (1210 – 1277) na Bolonha, mas os princípios técnicos dos reparos de nervos periféricos fundamentam-se nas observações de Waller (1850), sobre a degeneração do coto distal e das projeções (sprouting) axoplasmáticas a partir do coto proximal do nervo seccionado.

Para a reconstrução de um tronco nervoso seccionado, é necessária a reaproximação dos cotos para restabelecer sua continuidade anatômica, e para isso tem ocorrido desenvolvimento contínuo de materiais especializados, como microscópio cirúrgico e instrumental cirúrgicos extremamente bem adaptados, fios

de sutura e micro-agulhas adequadamente finas e cola de fibrina, além de evolução das técnicas micro cirúrgicas.

Segundo alguns pesquisadores, nas lesões nervosas de mais de 3 cm de perda tecidual, ou seja onde ocorre falha de nervo, conhecidas como “gap” as simples conexões, como as suturas epineurais, as neurorrafias término-terminais, são inadequadas, sendo mais indicadas as de enxerto autógeno (SUNDERLAND, 1978; HUDSON et al., 1979; MILLESI, 1982).

Em uma tentativa de reparo de lesões graves de nervos periféricos, WIBERG & TERENCEHI (2003) dizem que, a utilização de segmento nervoso para enxerto autólogo resulta em morbidade da área doadora, incluindo formação de cicatriz local, perda de sensibilidade e possível formação de neuroma doloroso. Além disso, os nervos doadores são freqüentemente de calibres pequenos e em número limitado, dificultando a sutura. Isso torna evidente a necessidade de utilizar-se método alternativo, objetivando construir uma ponte de conexão entre os segmentos nervosos remanescentes.

O método de tubulização, ou entubulização passou a ser uma das técnicas que tem sido mais usada nas pesquisas sobre reparo nervoso. Neste procedimento cirúrgico os cotos dos nervos seccionados são introduzidos e fixados em uma prótese tubular, deixando um espaço (“gap”) entre as terminações nervosas (OLIVEIRA, 2004).

Os tubos de silicone são comumente usados neste procedimento (OLIVEIRA, 2004), mas alguns pesquisadores têm proposto a utilização de tubos de tecidos autógenos, como por exemplo, enxertos venosos, (WALTON et al., 1989) e os resultados obtidos com este último material tem sido satisfatório (WALTON et al., 1989; WANG et al., 1993).

Como a utilização de enxertos venosos para reparo de nervo tem tido bons resultados na capacidade regenerativa das fibras nervosas, e como elas são encontradas em abundância e em locais de fácil acesso cirúrgico, pensou na proposição de uma técnica de tubulização usando-se a veia associada ao uso do tecido adiposo com tratamento do laser de baixar potência, que tem sido usado com sucessos nos processos de reparação tecidual.

Revisão de Literatura

A-) O MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

O músculo estriado esquelético é constituído por fibras musculares associadas a tecido conjuntivo, o qual agrupa um conjunto de células musculares em um determinado local do músculo, formando os fascículos musculares. Estas fibras musculares são compostas de unidades funcionais chamadas sarcômeros. Em cada sarcômeros estão as proteínas miofibrilares, miosina (de filamento grosso) e actina (de filamento fino) (SCOTT W. et al., 2001).

A1 – MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DESNERVADO.

Embora os músculos desenvolvam-se inicialmente sem influência neural, subsequente a atividade do sistema nervoso e a força mecânica interferem no estágio pós-maturação das fibras musculares (KINGHAM et al., 2005).

As características que distinguem os músculos desnervados dos músculos innervados têm sido estudadas desde a Segunda Guerra Mundial, quando em 1944 Bowden e Gutmann observaram que nos músculos desnervados normalmente ocorria uma mudança na cor e uma redução de volume e peso. Estas alterações têm sido tema de várias investigações que abrangem diversos tipos de músculos e animais. A atrofia é detectada a partir do terceiro dia e estabilizada a partir do segundo mês mantendo apenas 20% a 40% da massa muscular original (SUNDERLAND e RAY, 1950).

Após o músculo ter cessado a perda de peso, admite-se que cerca de 10 a 25% do músculo normal é tecido conjuntivo, o que sugere uma considerável destruição e eliminação dos elementos contráteis constitutivos (KNOWLTON e HINES, 1936).

As fibras musculares atrofiam rapidamente nos períodos iniciais de desnervação, de forma que nos primeiros 60 dias a área de secção transversal média de uma fibra está reduzida em até 70%. O processo se faz mais lento após este período, avançando apenas mais 10% em 120 dias, e a partir deste momento a atrofia varia de 80 a 90%. Em todo o estágio de desnervação, a porcentagem de

diminuição do diâmetro da fibra muscular supera a porcentagem da perda de peso de todo músculo. Esta diferença entre redução de peso e de calibre se explica por um aumento relativo no volume de tecido conjuntivo, que compensa de alguma forma a maior atrofia das fibras (SUNDERLAND e RAY, 1950).

Nas fibras dos músculos desnervados os núcleos se apresentam maiores e mais ovais a partir do 9º ao 16º dia, e persistem assim até que a atrofia das fibras esteja estabelecida, quando eles passam a apresentar sua forma alongada original (TOWER, 1935; BOWDEN e GUTMAN, 1944; ALTSCHUL, 1948; ADAMS et al., 1962; GUTMANN e ZELENÁ, 1962). Devido a atrofia muscular, vários núcleos se movem para o centro das fibras. Esta movimentação do núcleo é imposta para sua preservação (BOWDEN e GUTMANN, 1944).

A atrofia se inicia na periferia da miofibrila, mas após o primeiro mês de degeneração se torna visível em seu interior. Durante a primeira semana, a mitocôndria de ambas as fibras, vermelhas e brancas, aumentam em um eixo longitudinal nas fibras. Conseqüentemente, as organelas encolhem e se agrupam; algumas mitocôndrias sofrem diminuição de número e tamanho e são digeridas por vacúolos autofágicos. Simultaneamente, o retículo sarcoplasmático, a princípio aumenta e depois diminui, embora menor do que a própria fibra. Na microscopia eletrônica observam-se também anormalidades na banda Z, e um aumento do número de ribossomos pode ser encontrado entre as miofibrilas e a superfície da membrana (McCOMAS 1996).

As mudanças não incluem todas as fibras musculares de maneira uniforme. O número de mionúcleos das fibras do músculo Sóleo de rato reduzem cerca de 43% em 10 semanas de desnervação, enquanto que no músculo Extensor Longo dos Dedos não foi alterado (SCHMALBRUCH & LEWIS, 2000). A mudança mais precoce e característica na morfologia das fibras desnervadas são a perda do sarcoplasma e a redução de seu calibre (SUNDERLAND e RAY, 1950; PELLEGRINO e FRANZINI, 1963; TOMANEK e LUND, 1973; LU et al., 1997) e desorganização ultraestrutural das fibras (PELLEGRINO e FRANZINI, 1963; TOMANEK e LUND, 1973; LU et al., 1997).

Outra característica notável encontrada em um quadro de desnervação é a proliferação de tecido conjuntivo, que aparece em primeiro lugar no perimísio e que logo afeta o endomísio, no qual o depósito de novo material fibrilar em ambas as

regiões vão sempre precedidas de um importante aumento de número de fibroblasto (SUNDERLAND, 1950). Em nenhum estágio se observa a substituição de tecido muscular por tecido fibroso, mas se encontra tecido adiposo em alguns músculos desnervados (BOWDEN e GUTMANN, 1944; RODRIGUES, et al. 2005).

SCHMALBRUCH e LEWIS (2000) afirmam que, uma completa destruição das fibras muscular pode eventualmente ocorrer, e que durante um longo tempo de desnervação, são realizados repetidos ciclos de regeneração e necrose, com a fase de necrose durando apenas dois dias, conseqüentemente ocorrendo a ocupação de células de tecido adiposo entre os espaços das fibras.

A2 – TIPOS DE FIBRAS EM MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.

Durante muito tempo pensou-se que as fibras musculares fossem todas semelhantes entre si, até quando se observou que o tecido muscular dos vertebrados revelava diferentes intensidades de coloração, inter e intramuscular (RANVIER, 1874). Esta característica macroscópica mereceu uma atenção especial, e a partir desta observação os músculos passaram a ser classificados como vermelhos e brancos.

Estudos posteriores mostraram que esses músculos apresentavam diferenças na densidade vascular, além de outras variações intrínsecas, e diferenças na velocidade de contração, e a partir de então os pesquisadores passaram a afirmar que os músculos vermelhos eram de contração lenta e os brancos de contração rápida. Este conceito permaneceu por muito tempo, mesmo frente às claras e importantes evidências de exceções citadas por alguns pesquisadores (MEYERS 1875; PAULKUL, 1904) onde alguns músculos vermelhos não apresentavam velocidade de contração lenta.

Com o advento da histoquímica, usando-se uma análise para avaliar a atividade m-ATPásica das fibras musculares, foi possível identificar dois tipos de fibras, um ácido estável e outro alcalino estável, que passaram a ser chamadas de tipos I e II, respectivamente (PADYKULA & HERMAN 1955). Investigações futuras sobre a sensibilidade do pH nas reações de m-ATPase das fibras musculares, pode-se notar a existência de subtipos de fibras do Tipo II e passaram a usar a nomenclatura de I, IIA, IIB e IIC (BROOKE & KAISER, 1970).

Os pesquisadores observaram também, a existência de uma variação no nível de atividade enzimática metabólica dentro de cada tipo de fibra, que eram classificadas apenas com base na atividade m-ATPásica. Análises microfotométricas da atividade de succinato de desidrogenase (SDH) revelaram uma diferenciação entre as fibras dos tipos IIA e IIB (REICHMANN & PETTE, 1982). Com base nestas informações as fibras musculares passaram a ser classificadas também como FG, FOG e SO (PETER et al., 1972).

A histoquímica permitiu observar que os músculos estriados de alguns animais eram formados predominantemente por um tipo de fibra muscular, mas outros eram formados por vários tipos de fibras, onde as fibras de contração lenta (ou tipo I, ou tipo SO) aumentavam a sua frequência no sentido de superficial para profundo, enquanto que nas de contração rápida (Tipos II, ou tipos FG e FOG) ocorria o contrário (ARIANO et al., 1973; GONYEA & ERICSON, 1977).

As pesquisas mostraram que a atividade m-ATPásica estava relacionada com a cadeia pesada de miosina (MHC) (WEISS et al., 1999) e que a diminuição da velocidade de contração estava relacionada com a composição da MHC (BOTINELLI et al., 1991). Estas informações fizeram com que a cadeia pesada de miosina passasse a receber maior atenção nas pesquisas musculares sobre a velocidade de contração dos mesmos.

A descoberta de diferentes anticorpos para as miosinas de músculos humanos levou a análise imunohistoquímica dos tecidos musculares (BILLETER et al., 1980). Usando anticorpos de miosina de coelho foi estabelecida uma correlação entre os tipos de fibras identificados histoquimicamente e a composição de miosina (BILLETER et al., 1980). Embora o genoma humano contenha pelo menos 10 genes para miosina de cadeia pesada, apenas três maiores tipos são expressos nos músculos de humanos adultos, correspondendo às expressões: MHCI, MHCIIa e MHCIIx/d respectivamente (PETTE e STARON, 1999).

Na fase de desenvolvimento os músculos apresentam duas outras isoformas de MHC, as MHCemb e MHCneo, que desaparecem após este período (STARON, 1997). Alguns músculos como os branquioméricos e extrínsecos do globo ocular, podem apresentar, mesmo na fase adulta, as MHCemb e neo, além MHCton e alfa card (STARON, 1997).

Unindo-se as técnicas de imunohistoquímica e de eletroforese, no estudo das fibras musculares individuais, pode-se identificar a existência de fibras musculares puras (que contém apenas uma isoforma de MHC) e híbridas (que contém duas ou mais isoformas de MHC) (PETTE & STARON, 2001). Assim, a classificação das fibras híbridas entre as puras passou a ser: **tipo I** - tipo I/IIA - tipo IIA/I – tipo **IIA** – tipo IIA/D – tipo IID/A – **tipo IID** – tipo IID/B – tipo IIB/D – **tipo IIB** (PETTE et al., 1999; SCHIAFFINO E REGGIANI, 1996.)

Antigamente as fibras musculares eram consideradas unidades totalmente fixas, mas hoje se sabe que elas são células dinâmicas com um extraordinário poder de adaptação. Seus perfis fenotípicos são afetados pela inervação, treinamentos com carga, hormônios e envelhecimento. (PETTE & STARON, 2001; HYATT et al., 2003; ISHIDO et al., 2004).

A diversidade funcional das fibras musculares de um músculo está diretamente ligada ao seu padrão de inervação (PETTE & STARON, 1990; PETTE & VRBOVÁ, 1992), assim uma análise da MHC pode ser usada para determinar o efeito de intervenções sobre um músculo, inclusive a desnervação (KINGHAM et al., 2005).

Pelos experimentos de reinervação cruzada realizada por (BULLER et al. 1960), as mudanças do fenótipo muscular são primariamente devido aos padrões de impulso neural específico liberado nos músculos.

A perda da inervação, não apenas pela desnervação experimental, mas também por acidentes, leva à deterioração fisiológica e funcional das fibras afetadas, (SUNDERLAND & RAY, 1950; GUTMANN & ZELENÁ, 1962; BORISOV et al., 2001; GERMINARIO et al., 2002), redução no peso e área de seção transversal das miofibras (DESCHENES et al., 1997; LU et al., 1997).

A área de secção transversal é uma das propriedades mais importantes dos músculos estriados, porque ela é usada como um dos parâmetros para se determinar a força máxima que um músculo pode produzir sob condições isométricas (WOLEDGE et al., 1985; CAIOZZO, 2002). Esta área da fibra muscular é regulada por vários caminhos e/ou mecanismos. Estudos têm mostrado uma relação direta entre a área de secção transversal de uma fibra muscular e o número de mionúcleos (ALLEN et al., 1995; ROSSER et al., 2002). Assim, a condição de hipertrofia está associada a um aumento de mionúcleos enquanto que a atrofia das

fibras musculares esta associada com a perda de mionúcleos (ALLEN et al., 1995; SCHMALBRUCH & LEWIS, 2000).

Em prática, hoje se sabe que em período longo de desnervação, a redução na área de secção transversal das miofibras é maior nas fibras de contração rápida, estudo feito no músculo Extensor Longo dos Dedos, onde houve uma redução de 65% em um período de 7 meses de desnervação, sugerindo que os mionúcleos da fibra tipo II podem ser mais susceptíveis a desnervação por períodos longos. (BJUSZ, 1964; LU et al., 1997; VIGUIE et al., 1997; DUPONT-VERSTEEGDEN et al. 1998; WALTERS et al. 2000).

A-3 CÉLULAS SATÉLITES (CS)

As células satélites (CS) foram descritas inicialmente em 1961, em fibras musculares de rã (MAURO, 1961), que foram assim denominadas por sua localização anatômica na periferia da fibra muscular. Elas são células indiferenciadas e mononucleadas, cuja membrana basal esta em continuidade com a membrana basal da fibra muscular. Enquanto o tecido muscular esquelético mantém-se livre de agressões, as CS permanecem em estado de quiescência (repouso), (YABLONKA-REUVENI, 1994).

Num caso de desnervação, por exemplo, se ocorrer por um período mais longo, ela pode induzir as miofibras a apoptose (YOSHIMURA & HARII, 1999), mas na tentativa de reparo, ocorre a ativação e proliferação das células satélites (CS), que são células miogênicas precursoras do músculo esquelético adulto (MURRAY & ROBBINS, 1982; SNOW, 1983; VIGUIE et al., 1997).

Apesar de alguns pesquisadores dizerem, que atividade neural aumentada induz a hipertrofia muscular (ROY et al., 1982; ISHIHARA et al., 1998), enquanto que sua ausência, tais como desnervação, resulta em atrofia muscular (VIGUIE et al., 1997; HYATT et al., 2003), outros afirmam que após a desnervação de um músculo ocorre um aumento na proliferação e diferenciação de células satélites (MURRAY & ROBBINS 1982; SNOW 1983; ANZIL & WERNIG, 1989; McGEACHIE, 1989; DEDKOV et al., 2001), mas que o tecido muscular não pode ser mantido após um longo período de desnervação (IRINTCHEV et al., 1990).

Apesar de um tanto paradoxal, o que se encontra na literatura é que o músculo estriado desnervado conduz a um acelerado nível de ativação de células satélites (HESS & ROSNER, 1970; VIGUIE, et al., 1997), e que a desnervação por longo período leva a uma queima destas células e subseqüentemente morte das fibras musculares devido uma inabilidade para manter o número apropriado de mionúcleos (RODRIGUES & SCHMALBRUCH, 1995).

Para tentar explicar este fato, deve ser lembrado que os músculos possuem proteínas que pertencem aos fatores regulatórios miogênicos (**MRFs** - myogenic regulatory factors), que são a Miogenina e o MyoD, pertencentes a família de proteínas “ *basic helix-loop-helix*” que também incluem outras proteínas (como o Myf-5 e o MRF4). Estas proteínas são consideradas marcadores de CS, e estão envolvidas no desenvolvimento e hipertrofia do músculo estriado, modulação e divisão na miogênese. Uma vez que as células satélites são ativadas elas podem incorporar a fibra muscular a ela associada formando um novo núcleo dentro da fibra muscular, ou incorporar com outra CS para formar uma nova fibra (SCHULTZ, 1996). Recente estudo demonstrou que apenas 50% das CS que proliferam entram em fase final de diferenciação, expressando a proteína miosina do desenvolvimento.

A proteína MyoD é um excelente marcador para CS ativadas, sendo encontrado em elevados níveis no músculo em regeneração, e de neonatos presentes em estágios iniciais do desenvolvimento (MOLKENTIN et al., 1995; KOISHI, 1995)

As células da linhagem miogênica em proliferação, positivas para Myf5 e/ou MyoD, são então denominadas de mioblastos (MEGENEY; RUDNICKI, 1995). Os mioblastos que saem do ciclo celular, positivos para Myf5 e MyoD, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão dos MRFs miogenina e MRF4, os quais regulam a diferenciação dessas células (MEGENEY; RUDNICKI, 1995), para finalmente, no processo de miogênese, os miócitos mononucleados se fundirem para formar os miotubos (Fig. 1) e, no animal adulto, o músculo esquelético tornar-se um tecido altamente especializado caracterizado por fibras musculares multinucleadas (SCHMALBRUCH; LEWIS, 2000).

Figura 1. Rede regulatória da diferenciação muscular. (AGUIAR, 2008).

A MyoD é expressada no tecido muscular estriado vivo em várias situações, em resposta a diversos estímulos, sugerindo que ela desempenhe um papel importante na plasticidade deste tecido (ISHIDO et al., 2004).

Vários trabalhos têm mostrado que a expressão de MyoD é rapidamente induzida em músculos estriados desnervados (VOYTIK et al., 1993; WALTERS, et al., 2000; HYATT et al., 2003), sua detecção ocorre 12 horas após um traumatismo muscular, juntamente com outras proteínas relacionadas com a diferenciação de células da linhagem miogênica, como desmina e miogenina (RANTANEN et al., 1995). E alguns pesquisadores consideram que este fato seria para prevenir a atrofia muscular (VOYTIK et al., 1993; WALTERS, et al., 2000), pois há um aumento na expressão da MyoD após a desnervação (ISHIDO et al. 2004).

B-) Apoptose

Em particular, apoptose é um tipo de morte celular que ocorre primeiramente a processos fisiológicos essenciais durante o desenvolvimento embrionário, e para homeostases teciduais, e que também está associado à processos e condições patológicas (DELHALLE, 2003).

Alguns genes que controlam a apoptose têm sido identificados por meio de estudos moleculares, analisando-se o passo inicial deste fenômeno. Este processo é iniciado e mediado por meio de dois caminhos principais: um “extrínseco” iniciado com ativação de receptores da família (TNF) na membrana plasmática, seguido por

ativação da caspase-8; e outro caminho “intrínseco”, iniciado com mudanças na integridade da membrana das mitocôndrias na qual leva a liberar citocromo c e ativando a caspase-9 (SPRICK, 2004). As caspases, uma família de proteases, são os executores pivô da apoptose, presentes nas vias intrínsecas e extrínsecas da morte celular. Por sinalizar e destruir determinadas proteínas, estas caspases são responsáveis por típicas mudanças morfológicas e bioquímicas na célula (ZIEGLER, 2004).

Em um ponto estritamente morfológico, a distinção entre apoptose e necrose, pode ser esclarecida por microscopia eletrônica (KERR, 1972; LEVIN, 1995; RODRIGUES, 2005). A necrose típica envolve muitos focos de células aumentadas, por perda da capacidade de manutenção de seus fluidos e eletrólitos balanceados, ocorrendo lise celular. Além disso, forma uma cromatina nuclear irregular condensada (picnoses) ou dissolvida (cariolises). Este processo causa uma resposta inflamatória significativa. A apoptose típica envolve células individuais ou pequenos grupos de células. As células diminuem, tornam-se mais eletro-densa, e perde o contato íntimo com células adjacentes. A morfologia da mitocôndria é geralmente normal, mas formam-se grupos de cromatina na periferia nuclear, e isto resulta em uma aparente característica histológica conhecida como cariorhexes. A célula se fragmenta intra membrana, formando corpos apoptóticos que contém um misto de organelas e fragmentos de núcleos. Corpos apoptóticos são geralmente fagocitados por macrófagos residentes ou migratórios, e não causa resposta inflamatória (KERR, 1972; LEVIN, 1995). Estas associações estão relacionado a desfragmentação do DNA causada na apoptose, que causa uma mudança ultraestrutural na morfologia da célula.

A fragmentação do DNA nas células em apoptose é examinada por alguns métodos, sendo um deles por ensaio da técnica de TUNEL, cuja tecnologia marca enzimaticamente parte da quebra da terminação livre 3'-OH com nucleotídeos modificados do DNA fragmentado (MAJNO & JORIS, 1995).

No músculo desnervado a apoptose ocorre resultando em uma atrofia muscular, e redução do número de células. Em períodos longos de desnervação, nos músculos brancos e vermelhos a apoptose responde de maneiras diferentes. Mas em uma forma de reverter esta perda tecidual, alguns fatores miogênicos são desencadeados para uma tentativa ou reparo do músculo esquelético.

C-) Lesão e recuperação do nervo periférico.

A lesão de nervo periférico pode ser ocasionada por diversos fatores, como traumatismo de âmbito cirúrgico ou não, infecção, ou durante uma ressecção de tumor (DOURADO et al. 2001). Traumas nervosos são freqüentes e resultam na sensibilidade e/ou motricidade no território inervado (WEINSTEIN & HERRING, 1992).

Diferentes terminologias foram propostas para classificar os traumas nervosos, entretanto todos concordam com três processos básicos neuropraxia, axionotmese e neurotmese (SEDDON, 1943).

A “neuropraxia” é a lesão nervosa de forma menos grave, é temporária e mantém íntegra a continuidade da bainha endoneural e dos axônios. Nesta lesão não ocorre degeneração Walleriana. A neuropraxia pode ser provocada por trauma ou isquemia local do nervo, e sua recuperação é total e espontânea, ocorrendo em poucos dias.

A “axionotmese” ocorre quando a continuidade do axônio é interrompida, mas há preservação da bainha endoneural. Esse tipo de lesão pode ser provocado por um forte trauma fechado, esmagamento do nervo ou tração extrema do nervo. A axionotmese provoca degeneração Walleriana, mas como a bainha epineural continua íntacta, a regeneração axonal pode ocorrer ao redor de um milímetro por dia (ROQUE 2008; ROQUE 2007), com recuperação da função do nervo entre dois a seis meses.

A forma mais grave de lesão de nervos é a “neurotmese”, que envolve completa perda de continuidade do mesmo, podendo ser causada por fraturas com deslocamentos desfavoráveis, faca, ou rompimentos por projéteis de arma de fogo ou mordidas de alguns animais (ROQUE 2008; ROQUE 2007).

Estas categorias podem ser subdivididas de acordo com o grau do trauma, a extensão linear e outros fatores. (TERZIS et al. 1975; SUNDERLAND 1978).

Lesões nervosas periféricas seguidas de neurotmese, geralmente, são reparadas através de sutura das duas extremidades do nervo. Esta técnica, porém, só é possível se o segmento nervoso lesado for de pequena extensão. Nas lesões mais extensas com perda tecidual, tais suturas criam situações de tensão,

prejudicando a irrigação local e conseqüente recuperação do tecido lesionado (TERZIS et al., 1975; SUNDERLAND, 1978).

Vários pesquisadores afirmam que, em geral, nas lesões nervosas do tipo neurotmeze, com distância maior do que três centímetros de comprimento entre os seus cotos, proximal e distal (“gaps” maior do que 3 cm), as simples conexões, como as suturas epineurais, são inadequadas, sendo mais indicado o enxerto autólogo, como por exemplo, de um nervo sensitivo, como o nervo sural, do próprio paciente (SUNDERLAND, 1978; HUDSON et al., 1979; MILLESI, 1982).

O calibre do nervo lesado é uma limitação que tem levado à utilização dos chamados “cable graft”, em que diversos segmentos do nervo doador são utilizados. A grande desvantagem desta técnica é a necessidade de um grande número de suturas que, via de regra, resulta na formação de cicatriz com conseqüente isquemia na região do implante. Além disso, o emprego de grande quantidade de “nervo doador” leva a uma perda de sensibilidade na região inervada pelo mesmo (FAWCET & KEYNES, 1986).

Diante dessas situações adversas, numerosos laboratórios têm voltado suas atenções na busca de soluções no reparo de lesões de nervos periféricos. Tais pesquisas envolvem materiais biológicos e não biológicos como: colágeno, artérias, veias, moléculas de adesão celular, tubos de silicone e polietileno (FIELDS et al., 1989).

GUDA et al. (1993) estudaram a regeneração do nervo safeno em coelhos utilizando enxerto venoso e não obtiveram resultados satisfatórios. Estes autores consideraram a hipótese de que o contato entre as células endoteliais do segmento venoso transplantado e o tecido nervoso tenha estimulado o desenvolvimento de tecido conjuntivo da parede do vaso, o que culminou com a constrição periférica do nervo antes deste iniciar sua regeneração.

ITOH et al. (1996) estudaram a regeneração do nervo ciático em ratos utilizando enxerto arterial e também não obtiveram resultados satisfatórios, devido, segundo eles, à deficiência de laminina na membrana basal para acelerar a neurotização (regeneração do nervo).

Outros autores concordam que a utilização de enxertos venosos pode ser útil apenas em secções nervosas de reduzido tamanho e em nervos monofasciculados (WALTON et al., 1989). Entretanto, ao utilizar enxertos venosos ao avesso em

nervos mistos, como o nervo ciático, foi observada grande melhora na capacidade regenerativa das fibras nervosas (WANG et al., 1993; FERRARI et al., 1999).

Alguns pesquisadores demonstraram que o colágeno e a laminina têm um efeito benéfico na regeneração nervosa periférica. Para isso eles usaram enxerto venoso ao avesso, expondo a túnica adventícia ao contato direto com axônios seccionados, constituindo num bom conduto para a regeneração de nervos com característica sensitiva, como por exemplo, o nervo safeno. Segundo estes autores, tal conduto, além de permeável a fatores externos, encontram-se “carregado” com fatores tróficos - tais como colágeno, laminina e fibronectina - em proporções ideais, propiciando um micromeio altamente favorável à regeneração axonal (LANDER et al., 1985; VALENTINI et al., 1987; FERRARI et al. 1999).

O que os pesquisadores não citaram, mas que deve ser lembrado é a quantidade de adipócitos presente na túnica adventícia dos vasos sanguíneos, que ao serem usados ao avesso ficaram expostos aos axônios lesados.

D-) O TECIDO ADIPOSEO

Uma das variedades de tecido conjuntivo é o adiposo, que se localiza principalmente, embaixo da pele, como coxins absorventes de choques na palma das mãos e planta dos pés e preenchendo espaços entre outros tecidos, além de manter vários órgãos em posição anatômica. No feixe vâsculo-nervoso este tecido está presente na superfície externa da túnica adventícia, assim, em contato íntimo com o epineuro dos nervos periféricos.

Existem basicamente dois tipos de tecido adiposo: unilocular e multilocular. A diferença principal está no fato que no tipo unilocular, encontra-se apenas uma gotícula de gordura em seu interior. E praticamente todo tecido adiposo presente em mamíferos adultos é do tipo unilocular. Já as células do tecido adiposo multilocular apresentam numerosas gotículas de gordura no citoplasma. O núcleo é redondo e excêntrico. Esta característica do núcleo é que auxilia na diferenciação com o tecido adiposo unilocular, podendo ser encontrado, por exemplo, na periferia do timo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Os adipócitos uniloculares são grandes, medindo em geral mais de 100 µm de diâmetro, sendo que cada adipócito está envolto por uma camada de

glicoproteína (glicocálix). Sua membrana plasmática apresenta inúmeras vesículas de pinocitose (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

CASTAÑEDA e KINNE (2002) utilizaram enxerto preparado a partir do omento maior, rico em tecido adiposo unilocular, para recuperar nervo ciático de ratos transeccionado experimentalmente. Eles observaram uma recuperação funcional significativa nos animais submetidos a essa técnica.

YOSHITANI et al. (2007) estudaram a recuperação do nervo frênico de cães por meio de enxertos feitos de tubo de colágeno preenchidos com ácido poliglicólico. Em um dos grupos experimentais os autores cobriram o enxerto com um retalho de pericárdio rico em adipócitos. Os resultados apontaram para uma melhor recuperação dos animais deste grupo, muito provavelmente pela ação benéfica do tecido adiposo justaposto ao enxerto.

Muitos laboratórios em todo o mundo estão utilizando células tronco adulta extraída de lipoaspiração. É sabido que tais células extraídas do tecido adiposo não precisam ser cultivadas por três semanas como outros tipos de células troncos. Assim, em apenas 2 horas milhares de células podem estar aptas para implantes.

Considerando-se a facilidade na obtenção do tecido adiposo; o mínimo de prejuízo para o organismo na obtenção do mesmo e principalmente pela presença de células tronco neste tecido, pensou-se: qual seria o resultado do uso tecido adiposo no reparo de nervo seccionado experimentalmente?

E-) O LASER.

O raio laser foi idealizado por Albert Einstein em 1917 (VEÇOSO, 1993). Mas, a partir de 1960, houve um grande avanço nos equipamentos de laser, possibilitando o seu uso em cirurgias oftálmicas com sucesso, e mais tarde, em 1965 houve sua adaptação como fins terapêuticos (COLLS, 1984).

Desde a sua concepção, os lasers encontraram uma aplicação imediata na medicina, e particularmente na cirurgia, porém em estudos mais recentes, os pesquisadores voltaram-se para as possíveis aplicações clínicas das interações atômicas da luz do laser com os tecidos (BAXTER, 1994).

GENOVESE (2000) classifica o laser em dois tipos: laser de alta intensidade (potencial destrutivo) e laser de baixa intensidade (sem potencial destrutivo), ambos formados por ondas eletromagnéticas.

O laser de arsenieto de gálio (AsGa), classificado como de baixa potência, segundo GENOVESE (2000) emite uma radiação obtida através da estimulação de um diodo semiconductor, formado por cristais de arsenieto de gálio, também conhecido como laser semiconductor ou laser diodo. A passagem da corrente elétrica nesse diodo resulta na obtenção de energia, que amplificadas pelas extremidades do diodo, escapam e formam a radiação laser. O laser AsGa tem-se as características básicas , que são: 1)Regime de emissão pulsado; 2) Comprimento de onda próximo a 904nm; 3) Cor infravermelha.

O laser AsGa apresenta um potencial terapêutico em lesões profundas dos tipos: articular, muscular, ligamentar, nervosas, entre outras, (VEÇOSO, 1993). KOLARI (1985) confirmou que além de possuir um maior poder de penetração, este tipo de laser apresenta outras vantagens como tamanho e custo reduzido, seguridade e simples aplicação que o aparelho possui.

Os efeitos terapêuticos do laser AsGa, segundo COLLS (1984) são descritos como:

A-) Analgésico - explicada por fatores antiinflamatório a nível local, reduzindo a inflamação, provocando reabsorção de substratos e favorecendo a eliminação de substâncias alógenas, através do estímulo da microcirculação, e interferência da mensagem elétrica através da manutenção do potencial de membrana. Com isso proporcionaria uma menor sensação dolorosa, estimulando liberação de inúmeros neurotransmissores evitando a redução do limiar de excitabilidade dos receptores dolorosos, provocando assim a normalização e o equilíbrio da energia no local da lesão;

B-) Antiedematoso - atua na microcirculação garantindo um aporte eficiente de elementos nutricionais e defensivos para a região lesada, além de favorecer melhores condições de drenagem do plasma, que forma o edema e ação fibrinolítica, proporcionando a resolução efetiva do isolamento causado pela coagulação do plasma, que determina o edema duro;

C-) Cicatrizante, para os autores, este é o efeito que mais se destaca, e é caracterizado como incremento na produção de ATP. O laser eleva a produção de

ATP, proporcionando um aumento de atividade mitótica, facilitando a multiplicação das células e aumento da síntese protéica por intermédio da mitocôndria. Este aspecto é apoiado por outros pesquisadores também (VEÇOSO, 1993; GRECO et al. 1989; KARU et al. 1995).

BIBIKOVA et al, (1994) e REDDY et al., (1998) demonstram experimentalmente, que o laser terapêutico de baixa potência possui um efeito cicatrizante através do aumento da estimulação da matriz colagenosa.

O laser passou a ser utilizado no processo de regeneração e recuperação funcional de lesões nervosas periféricas na década de 80, havendo vários relatos sobre resultados obtidos.

OLSON et al. (1981) utilizaram a irradiação laser, com comprimento de onda variando entre 490 e 685nm, sobre células do cérebro de ratos, para observar alterações nos limiares de excitabilidade celular. Segundo os resultados obtidos, houve uma diminuição da excitabilidade elétrica das células nervosas, sugerindo que, ocorre uma absorção de energia irradiada capaz de provocar alterações com a liberação de cálcio no citoplasma.

WALKER (1985) relatou que a aplicação bilateral do laser nos nervos safenos de paraplégicos, durante 40 segundos, foi capaz de suprimir o clônus do tornozelo. Tal efeito não foi observado nos pacientes não irradiados, o autor sugeriu que os efeitos obtidos poderiam ser decorrentes de uma fotosensibilidade dos nervos periféricos.

ROCHKIND (1986), através da irradiação transcutânea de nervos ciáticos de ratos, observou um aumento significativo no potencial de ação, efeito que poderia perdurar por até oito meses após a última aplicação.

Em 1987 ROCHKIND et al. estudaram o potencial de uso terapêutico da irradiação de laser de baixa potência na prevenção da degeneração ou na estimulação da regeneração nervosa periférica. Após lesões de nervo ciático de ratos, durante 20 dias consecutivos, realizaram o tratamento com laser de baixa potência, observando um aumento significativo da amplitude do potencial de ação nervosa no lado lesado, que alcançou níveis semelhantes aos valores do lado não lesado. Esta manifestação eletrofisiológica do efeito do laser foi acompanhada por uma diminuição do volume de tecido cicatricial nos nervos lesados.

ROCHKIND e colaboradores em 1988 conduziram uma série de experimentos para investigar os efeitos da irradiação com laser, entre eles, lesões de nervos periféricos, mais especificamente no nervo ciático. Os animais eram submetidos a altas doses de irradiação diariamente, e os parâmetros de medição eram eletrofisiológicos. Concluíram que a quantidade de irradiação que alcançava o nervo ciático, de ordem de 2% a 10%, era pequena em relação àquela que atingia a pele, de modo que os resultados de um eventual tratamento poderiam não ser satisfatórios.

ASSIA et al (1989) observaram uma diminuição do processo de degeneração após lesão de nervo ciático de ratos utilizando o laser aplicado sobre a região lesada.

HAMILTON, RAY (1992) conduziram um estudo para determinar se a irradiação com laser poderia alterar o processo de regeneração de um nervo. Foram utilizados 12 coelhos divididos em dois grupos (tratado e não tratado), que tiveram os nervos peroneais lesados. Os resultados mostraram que no grupo tratado, a recuperação da lesão após 15 dias foi em média 67% do nível de amplitude de condução pré-lesão, enquanto que no grupo pré-tratado, a recuperação foi em média de 52%.

WALSH; LOWE; BAXTER (1995) investigaram os efeitos da irradiação direta com laser no nervo ciático de sapos. Sob condições monitoradas e cuidadosamente controladas, demonstraram um aumento da latência de condução nervosa em resposta a irradiação com baixas dosagens. Com laser, as doses mais altas provocaram um aumento no tempo de latência.

Todos os estudos encontrados na literatura consultada, que investigaram a ação do laser de baixa potência, indicam até o presente momento que este agente físico pode ser apresentado como auxiliar na regeneração de lesões nervosas, embora os resultados apresentados até agora sejam contraditórios, particularmente no que se diz respeito aos mecanismos envolvidos no processo de regeneração e recuperação.

F-) ANÁLISE FUNCIONAL DE NERVOS PERIFÉRICOS.

Inúmeros são os métodos para se obter dados funcionais de experimento de nervo periférico, mas poucos são de baixo custo e benefício para o pesquisador. Aparelhos modernos são caros, e o estudo da recuperação de lesões nervosas periféricas do isquiático, com base nos métodos de (DE MEDINACELI; FREED; WYATT, 1982) obtidos por meio da análise motora, é considerado um bom critério de avaliação para a quantificação do grau de avaliação nervosa, e não tem um custo elevado.

Em 1989, Bain, Mackinnon e Hunter elaboraram um método com o objetivo de desenvolver e testar equações independentes e confiáveis para avaliações funcionais da regeneração dos nervos isquiático, tibial e fibular. Utilizaram em seus experimentos ratos Wistar, e em cada grupo experimental o nervo alvo seccionado, foram postos seus cotos em direção oposta intramuscular. Eles obedeceram às seguintes regras: a lesão seria produzida experimentalmente num dos ramos do nervo, mas os demais seriam preservados; e o lado experimental seria escolhido ao acaso, em cada animal.

Os autores obtiveram as impressões da marcha das patas dos animais em tiras de filme de raios X, seguindo o método de De Medinaceli; Derenzo; Hunter (1982). De posse das impressões foram efetuadas as seguintes medições: distância ao pé oposto (TOF); comprimento da pegada (PL); distância entre a pegada e a linha média da marcha (PA); distância do primeiro ao quinto dedos (TS); distância entre o segundo e quarto dedos (IT). Estas medidas foram feitas para as pegadas das patas dos membros pélvicos direito e esquerdo do mesmo animal.

Em seguida, os autores geraram um fator, a partir de cada uma das medidas de marcha por meio da subtração de valores das patas normais e patas experimentais, e dividindo-se esta diferença pela medida normal (equação (1), (2)):

$$FatorGerado = \frac{ValorExperimental - ValorNormal}{ValorNormal}$$

(1)

Obtendo assim:

<i>Fatores</i>		
Distância ao pé oposto	TOF	(ETOF-NTOF)/NTOF
Comprimento da pegada	PFL	(EPL-NPL)/NPL
Ângulo da pegada	PAF	(EPA -NPA)/NPA
Espalhamento dos dedos	TSF	(ETS-NTS)/NTS

(2)

Fonte: YAMASITA (2007). Fatores.

Na análise, os autores utilizaram a regressão como o déficit do nervo; índice funcional do isquiático, com o valor de -100 (cem) em animais com o nervo isquiático seccionado e de zero em animais do grupo controle. E em 1989, pela primeira vez, Bain, Mackinnon e Hunter empregaram análises da variância significativa das variáveis nas trilhas e dos fatores criados, e após medições e seleção das variáveis a serem usadas, e de posse da matriz de constante de peso resultante da análise de regressão linear múltipla, foram determinada uma equação para o índice funcional independente do nervo isquiático (YAMASITA, 2007).

Considerando-se que:

a-) embora os músculos desenvolvam-se inicialmente sem influência neural, subsequente a atividade do sistema nervoso interfere no estágio pós-maturação das fibras musculares;

b-) os efeitos da desnervação, sobre os músculos estriados, são reversíveis, desde que uma nova reinervação seja feita dentro de um período de tempo razoável, restabelecendo-se o contato nervo-músculo;

c-) novas técnicas de tubulização para recuperação de lesões nervosas devem ser sugeridas para restabelecimento do contato nervo-músculo;

d-) o tecido adiposo, que normalmente esta presente nos feixes vâsculo nervosos, tem uma quantidade considerável de células tronco que devem atuar como fator trfico na regeneração axonal;

e-) os estudos que investigaram a ação do laser de baixa potência, indicaram até o presente momento, que este agente físico pode ser apresentado como auxiliar na regeneração de lesões nervosas, pensou-se em verificar se o tecido adiposo e o laser de baixa potência, individualmente ou em conjunto, alteram os resultados da reinervação, por tubulização, em músculos de contração rápida (EDL), aproximando-os mais de um controle negativo (músculo desnervado), ou de um controle positivo (músculo normal).

Para isso sro observados:

a-) a freqüência e a área dos diferentes tipos de fibras musculares que formam o músculo EDL, por meio das reações histoquímicas e morfometria;

b-) imunomarcação de novos mionúcleos e células satélites por meio de imunofluorescência dos antígenos nucleares para proliferação celular (MRF's) – MyoD e Miogenina;

c-) marcação de células apoptóticas, por meio da reação de TUNEL.

d-) teste fisiológico, utilizando Análise Funcional da marcha.

Materiais e Métodos

Animais de experimentação.

Foram utilizados 84 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, jovens, machos, com 80 dias de idade, pesando em média 285g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB – USP) – Campus de Bauru – SP.

Os 84 animais foram distribuídos em doze grupos constituídos de sete animais cada, sendo, quatro grupos controles, e oito experimentais.

Grupos Controle

Grupos Controle Positivos

Nestes grupos os animais não foram submetidos a nenhuma cirurgia e foram sacrificados (como descritos posteriormente), aos 45 e 150 dias após o dia da cirurgia dos animais dos grupos experimentais, e receberam os nomes de **GCP45** (Grupo Controle Positivo 45 dias) e **GCP150** (Grupo Controle Positivo 150 dias), respectivamente. Os animais destes grupos foram usados como controles positivos.

Grupos Controle Negativos

Os animais destes grupos foram submetidos à cirurgia onde o seu nervo ciático foi seccionado e os seus cotos foram suturados em direção oposta, sendo o proximal no músculo adjacente e o distal na tela subcutânea. Estes animais foram sacrificados nos tempos de 45 e 150 dias após a cirurgia onde os seus nervos ciáticos foram seccionados e receberam os nomes de **GCN 45** (Grupo Controle Negativo 45 dias) e **GCN 150** (Grupo Controle Negativo 150 dias), respectivamente. Os animais destes grupos foram usados como controles negativos

Grupos Experimentais

Grupo Experimental Veia Vazia

Os animais deste grupo foram submetidos à cirurgia de tubulização, como descrito no protocolo cirúrgico, e foram sacrificados nos tempos de 45 dias e 150

dias e receberam os nomes de **GEVV45** (Grupo Experimental Veia Vazia 45 dias) e **GEVV150** (Grupo Experimental Veia Vazia 150 dias) respectivamente.

Grupo Experimental Veia Gordura

Os animais deste grupo foram submetidos à cirurgia de tubulização, como descrito no protocolo cirúrgico e tiveram a veia usada na tubulização preenchida por gordura, e foram sacrificados nos tempos de 45 dias e 150 dias após a cirurgia e receberam os nomes de **GEVG45** (Grupo Experimental Veia Gordura 45 dias) e **GEVG150** (Grupo Experimental Veia Gordura 150 dias) respectivamente.

Grupo Experimental Veia Vazia e aplicação de Laser

Os animais deste grupo foram submetidos à cirurgia de tubulização, como descrito no protocolo cirúrgico, receberam tratamento com laser de baixa potência e foram sacrificados nos tempos de 45 dias e 150 dias após a cirurgia, e receberam os nomes de **GEVVL45** (Grupo Experimental Veia Vazia e Laser 45 dias) e **GEVVL150** (Grupo Experimental Veia Vazia e Laser 150 dias) respectivamente.

Grupo Experimental Veia Gordura e aplicação de Laser

Os animais deste grupo foram submetidos à cirurgia de tubulização, como descrito no protocolo cirúrgico, tiveram a veia usada na tubulização preenchida por gordura, receberam tratamento com laser de baixa potência e foram sacrificados nos tempos de 45 dias e 150 dias após a cirurgia, e receberam os nomes de **GEVGL45** (Grupo Experimental Veia Gordura e Laser 45 dias) e **GEVGL150** (Grupo Experimental Veia Gordura e Laser 150 dias) respectivamente.

Protocolo cirúrgico

A-) Anestesia e assepsia dos animais.

Os animais foram anestesiados, com injeção intramuscular de Cloridrato de Tiletamina, associado com Cloridrato de Zolazepam (50mg/Kg) na região dorso lateral da coxa esquerda e realizada a tricotomia da face dorso-lateral do membro pélvico direito em todos os grupos experimentais e no controle negativo, e da face

ventral do pescoço nos grupos experimentais. Em todos os grupos experimentais e controle negativo foram adotadas técnicas assépticas para os procedimentos cirúrgicos.

B-) Retirada da Veia Jugular externa.

Para retirada da veia jugular externa foi efetuada uma incisão paramediana, de aproximadamente dois centímetros de comprimento, no sentido longitudinal, na face ventral da metade esquerda do pescoço dos animais dos grupos experimentais. A pele e a tela subcutânea foram rebatidas, e em seguida efetuadas a divulsão dos músculos subjacentes para dissecação e exposição da veia jugular externa, promovendo seu isolamento e ligadura de suas tributárias. Para a retirada da veia jugular externa foi feito um pequeno corte na referida veia, e por ele foi introduzida um fio ortodôntico inoxidável de 0,06mm (Fig. 2D), e a seguir as suas duas extremidades foram cortadas, retirando-se um segmento medindo cerca de dois centímetros de comprimento (Fig. 2A,B,C). Esse segmento foi mantido em solução fisiológica, a temperatura ambiente, até sua utilização na fase da tubulização do nervo ciático. Posteriormente a pele e a tela subcutânea do pescoço foram suturadas com fio de algodão 4-0.

Figura 2. Em (2A) assepsia do pescoço do rato, em (2B) retirada da veia jugular externa, e em (2C) a veia extraída e mantida em meio de solução fisiológica. (2D) Fio ortodôntico inoxidável de 0,06mm.

C –) Secção do nervo ciático

Com os animais em decúbito ventral, fixados em uma placa de cortiça pela suas patas, com fita adesiva, foi realizada uma incisão longitudinal na face dorso lateral da coxa direita, de aproximadamente dois centímetros de comprimento, rebatendo-se a pele, a tela subcutânea. A seguir os músculos adjacentes foram divulgados para exposição do nervo ciático. Após a identificação do referido nervo ele teve a remoção de um segmento medindo cerca de 1,5 centímetro, e em seu local foi colocada a veia jugular externa, retirada anteriormente, realizando a tubulização do nervo (Fig. 3). A tubulização foi realizada com a veia na posição normal e contendo ou não gordura “*in natura*” em seu interior. As suturas dos cotos, proximal e distal, com a veia jugular externa, foram realizadas com fio mononylon 10-0. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas aquecidas com luz incandescente para evitar hipotermia e total recuperação após cirurgia.

Figura 3. Em (3A) assepsia da coxa direita do rato, em (3B) exposição do nervo ciático, e em (3C) tubulização por meio de enxerto venoso.

D-) Aplicação do Laser

Os animais que receberam o tratamento de Laser AsGa de pulso contínuo, durante a aplicação do mesmo eles foram imobilizados e cobertos com pano, expondo-se apenas o local da cirurgia no membro pélvico direito. A aplicação foi efetuada em diferentes pontos da cirurgia durante 90 segundos, com comprimento de onda de 820-830 nm. As aplicações foram realizadas no pós-cirúrgico e três vezes por semana, durante seis semanas (GIGO-BENATO et al. 2005). E em todas as aplicações, as emissões do feixe de laser foram calibradas no próprio aparelho (PHISOLUX dual – BIOSET) (Fig. 4A).

Os animais foram mantidos em caixas, com no máximo quatro animais cada uma, e receberam água e ração “*ad libitum*”, respeitando ciclos de 12 horas de luz, em temperatura média de 24°C.

Avaliação Funcional do nervo ciático.

Antes dos animais serem sacrificados para coleta do material, três deles, de cada grupo, foram selecionados aleatoriamente, para serem submetidos à avaliação funcional do nervo ciático.

Para esta avaliação os animais foram imobilizados, e a região plantar de suas patas posteriores foram pintadas com tinta de carimbo. No assoalho de uma canaleta de madeira, foi colocada uma faixa de papel para que os animais de todos os grupos caminhasse e deixasse as impressões de sua marcha (Fig. 4B,C). Este procedimento foi repetido duas vezes com cada animal.

A distância entre as impressões dos membros posteriores foram avaliadas segundo a equação descrita por Bain, Mackinon e Hunter (1989), com base nos estudos de De Medinaceli, Fred e Wyat (1982). As impressões com dificuldades de serem avaliadas foram descartadas, e as demais foram escaneadas e digitalizadas, obedecendo um padrão de calibração para cada imagem. As medições foram feitas com auxílio do programa Image Pro-plus 4.6.2, e os dados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico obedecendo ao índice de $P < 0,05$ para todas as amostras.

Figura 4. (4A) aparelho de laser-terapia de baixa potência, (4B) canaleta utilizada na análise da marcha dos ratos e (4C) impressões das patas do membro posterior para avaliação.

Coleta de amostras e Criopreservação.

Para retirada das amostras do músculo extensor longo dos dedos (EDL), os animais foram sacrificados com dose excessiva de anestésico (três vezes o valor da dose descrita na anestesia dos animais).

Para remoção do músculo EDL, foi realizada uma incisão na pele e tela subcutânea região ventro-medial do membro pélvico direito, para exposição, e retirada do mesmo.

Foram retiradas amostras de 1,0 cm de comprimento por 0,5 cm de espessura, acompanhando o sentido longitudinal das fibras do músculo EDL. As amostras foram envoltas em talco neutro, em seguida embebido em meio para congelamento (Tissue Tek) no interior de um blister (material que armazena cápsulas de medicamento), e imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido (Fig. 5A). Após o congelamento, as amostras foram armazenadas a -80°C em um freezer (INDREL, IULT 2430) para posterior processamento.

A seguir os fragmentos de músculos de cada animal foram submetidos a tratamento histológico, sendo cortados a uma espessura de 10µm em criostato marca (Leica CM 1850), e estes cortes foram retornados e armazenados no freezer a -80° C até a sua utilização.

Para a reação Histoquímica de m-ATPase e NADH-Tr cinco animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente, e os outros dois animais foram utilizados para a reação de imunohistoquímica, na técnica de Tunel, e para reação de imunofluorescência na marcação da expressão da proteína MyoD e Miogenina.

Histoquímica para m-ATPase e NADH

As lâminas histológicas do músculo EDL foram submetidas às reações de Adenosina Trifosfato Miofibrilar (m-ATPase) em pH 9,4 de acordo com PADYKULA & HERMAN (1955), com pré-incubação alcalina em pH 10,3 e a ácida em pH 4,35 e pH 4,55 conforme descrição de BROOKE & KAISER (1970), e as reações de Nicotinamida Adenina Tetrazólio Reductase (NADH-Tr), segundo a metodologia de PEARSE (1968), modificada por DUBOWITZ (1973).

Processamento para análise morfométrica.

As observações e as morfometrias do músculo EDL foram realizadas utilizando-se um micro computador (INTEL CORE™QUAD, 2.4GHz, 2.0Gb de RAM) com o software de captura e análise de imagem Image Pro-Plus 4.6.2, acoplado ao microscópio óptico (Olympus BX-50) e acoplado a este uma câmera fotográfica (Olympus DP-71), resolução de 12 mega pixels. Quatro monitores de tela plana, estavam ligados ao computador, auxiliando na visualização simultânea dos quatro diferentes tipos de reação histoquímica (m-ATPases pH 10,3; pH 4,35; pH 4,55 e NADH) para classificação das fibras em FG, FOG e SO, contagem, e morfometria (A^2) das 220 fibras musculares de cada animal estudado (Fig. 5B).

Figura 5. Em (5A) congelamento dos fragmentos musculares utilizando blister, (5B) fotomicroscópio e monitores para análise de imagens e morfometria.

Imunofluorescência.

Os cortes armazenados no freezer -80°C foram retirados e mantidos em temperatura ambiente (TA) por 30 minutos, e fixados em acetona gelada por 10 minutos no congelador. Depois de fixados, as lâminas foram lavadas com PBS por 10 vezes a 3 minutos cada banho, e posteriormente incubadas com leite mólico 5% + BSA 1% (Bovine Serum Avidin) por 90 minutos para bloqueio de ligação inespecífica. Em seguida as lâminas foram novamente lavadas com PBS, sendo três banhos de 5 minutos cada. Após, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário diluídos em Diluente de Anticorpo (Dako) e deixadas overnight a 4°C . Foram utilizados anticorpos primários contra Myod (anticorpo policlonal de coelho anti-myod, Santa Cruz Biotechnology, código sc-760, diluição 1:100) e contra Miogenina (anticorpo policlonal de coelho anti-miogenina, Santa Cruz Biotechnology, código sc-576, diluição 1:100).

Após o anticorpo primário, as lâminas foram retiradas da geladeira 30 minutos antes do procedimento para estabilizar a temperatura, lavadas com PBS (três vezes por 5 minutos) e incubadas com anticorpo secundário conjugados com fluoresceína: cabra anti-coelho IgG-PE (no caso quando utilizado primário contra miogenina), código sc-3739 na diluição 1:100; e camundongo anti-coelho IgG-FITC (no caso quando utilizado primário contra MyoD), código sc-2359 na diluição 1:100 (Santa Cruz Biotechnology,) por 90 minutos em temperatura ambiente, em seguida lavado com PBS (dez vezes, por 2 minutos cada). As lâminas foram finalizadas com meio de montagem (UltraCruz™ Mounting Medium: sc-24941, para fluorescência com DAPI, Santa Cruz Biotechnology) e armazenadas em congelador a -20°C ao abrigo de luz para posterior observação em microscópio a laser confocal (TCS mode, SPE, Leica, Mannheim, Germany).

Amostras de músculo esquelético desnervado por 12 horas foram usadas como controles positivos e negativos para cada reação.

Processamento Imunohistoquímico para detecção de Apoptose.

Este protocolo foi seguido conforme as recomendações do fabricante (ApopTag® Peroxidase *In Situ*, Apoptosis Detection Kit –S7100, Laboratório CHEMICON International) seguido de algumas alterações.

As lâminas dos músculos EDL, de todos os grupos, foram retiradas do freezer a -80°C por 30 minutos em TA para estabilizar a temperatura, em seguida foram fixadas em paraformaldeído 1% em PBS, pH 7,4 por 10 minutos em T.A. Depois de fixados, as lâminas foram lavadas com PBS por duas vezes a 5 minutos, e pós fixado em álcool gelado + ácido acético 2:1 por 5 minutos em temperatura -20°C. Seguido de uma nova lavagem em PBS, duas vezes por 5 minutos. Feito o Bloqueio da Peroxidase endógena (3% peróxido de hidrogênio em PBS) por 5 minutos, lavou-se novamente com PBS, duas vezes por 5 minutos. Após retirou-se o excesso de líquido em volta do tecido, e aplicou-se imediatamente 75µl de (*Equilibration Buffer*) por 10 minutos em T.A.. Em seguida retirou-se novamente o excesso em volta do tecido, e fora aplicado imediatamente 55µl de (*Working Strenght TdT Enzyme*), e incubado em câmara úmida a 37°C por 60 minutos.

Para lavagem, as lâminas foram colocadas imersas por 10 minutos na solução (*Working Strenght Stop/Wash Buffer*); seguida de uma nova lavagem em PBS, três vezes por 1 minuto cada; retirou-se o excesso em volta do tecido, fora aplicado 65µl de (*Anti-Digoxigenin Peroxidase Conjugate*), e incubado por 30 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente. Seguida de uma nova lavagem com PBS quatro vezes por 2 minutos cada, fora aplicado 75µl de *Peroxidase Substrate (DAB)* por 3-5 minutos, monitorando a coloração.

Para finalizar, as lâminas foram lavadas em Água destilada, três vezes por 1 minuto, e contra corado com *Verde de Metileno* por 10 minutos, e em seguida mergulhadas em Álcool 100% por 30 segundos para posteriormente serem montadas com lamínulas em meio de montagem *Permount*, e observadas em microscopia óptica.

Amostra de células epiteliais da glândula mamária, de rato fêmea (*Rattus norvegicus*) com quatro dias pós desmame, foi usada como controle positivo e negativo para cada reação.

Tratamento Estatístico

Análises entre os grupos, como os dados relativos à morfometria, e Análise funcional da marcha dos grupos de animais, foram submetidos ao teste estatístico one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Análises entre apenas dois grupos ou amostras, foram realizadas através do teste “t”. Possíveis correlações foram analisadas por meio de regressão linear e do teste de Pearson.

Para todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos foram aplicados através do programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc, EUA).

Resultados

A-) mATPase e HE do músculo EDL.

As amostras dos animais de todos os grupos, com exceção do GCN150, apresentaram resultados das reações de m-ATPase e NADH semelhantes e as fibras musculares puderam ser classificadas como FG, FOG e SO, como pode ser observada na Figura 6 e Quadro 1.

Figura 6. Resultado das amostras do músculo EDL submetidas a reações histoenzimológicas. 6A-) m-ATPase ácido, pH4.55; 6B-) m-ATPase ácido pH 4.35; 6C-) m-ATPase Alcalina pH 10.4; 6D-) reação NADH-Tr. 1= fibras do tipo SO; 2= fibras do tipos FG; 3= Fibras do tipo FOG.

Quadro 01 - Resultados das reações de m-ATPase e NADH-Tr a que foram submetidas às amostras do músculo EDL de rato (*Rattus norvegicus*).

Tipos de fibra	m-ATPase			NADH-Tr
	pH 4.55 Fig.6A	pH 4.35 Fig.6B	pH 10.4 Fig.6C	Fig.6D
FG=2	+	+	+++	+
FOG=3	++	+	+++	+++
SO=1	+++	+++	+	+++
+ reatividade fraca		++ reatividade moderada		++ reatividade forte

As fibras musculares dos animais do GCN150 estavam totalmente atrofiadas e desorganizadas, tornando-se difícil a caracterização do perfil histoenzimológico dos diferentes tipos de fibras, conforme Figura 7.

Figura 7. Fotomicrografia das fibras musculares do musculo EDL do grupo GCN150, submetidas à reações de mATPase. Em (7A) mATPase alcalina pH 10,5. Em (7B) mATPase acida pH 4,35.

O resultado da morfometria e percentagem dos diferentes tipos de fibras, das amostras do músculo EDL de todos os grupos, exceto do grupo CN 150, submetidos às reações de m-ATPase e NADH, estão apresentados na TABELA 1.

Tabela 1. Área média (em μm^2), desvio padrão (S.D.) e percentagem dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo EDL dos grupos estudados.

GRUPOS	Área (μm^2)						Percentagem					
	FG		FOG		SO		FG		FOG		SO	
	(A ²)	S.D.	(A ²)	S.D.	(A ²)	S.D.	(%)	S.D.	(%)	S.D.	(%)	S.D.
GCP45	2685,9	365	1227,3	131	893,4	1,1	48,48	25,6	50,45	24	1,06	2,08
GCN45	1085,3	256	659,9	82	880,5	199	16,06	18,9	78,18	23,5	5,76	8,14
GEVV45	1454,5	313	1052,5	376	1113,0	559	16,82	27	80,68	22,3	2,39	7,7
GEVVL45	1579,0	206	1129,9	198	1447,7	121	27,45	24,5	66,73	20,6	5,82	22,4
GEVG45	1405,7	475	876,3	175	1533,6	250	39,64	29,2	59,82	28,2	0,54	1,4
GEVGL45	1762,7	503	961,8	211	1326,2	92	21,36	14,9	77,91	12,8	0,73	0
GCP150	3488,2	193	1733,1	227	1289,4	329	32,18	12,1	64,82	8,2	3	4,2
GCN150	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GEVV150	3050,4	360	1701,4	485	1492,7	603	26,36	20,5	58,27	28,5	6,36	30
GEVVL150	2724,6	284	1663,4	50,2	1528,8	497	20,11	11,8	71,59	3,1	8,30	10
GEVG150	2853,7	321	1794,4	328	1362,5	85	25,68	30,9	64,66	39	11,14	11,1
GEVGL150	3373,2	504	1970,6	455	1210,7	3,2	31,06	1,5	68,03	3	0,91	0

Quando os dados foram submetidos ao tratamento estatístico, o programa não mostrou resultados para o tipo de fibra muscular SO, por não haver amostras suficientes para tal processo, uma vez que o músculo EDL é formado predominantemente por fibras de contração rápida.

Os dados comparativos sobre análise estatística, da área e percentagem dos diferentes tipos de fibras, encontrados no músculo EDL dos animais de diferentes grupos são encontrados nas TABELAS 2,3 e 4.

Tabela 2. Área média (em μm^2), desvio padrão (S.D.) e percentagem dos diferentes tipos de fibras encontrados no músculo EDL dos animais dos Grupos Controles positivos e negativos.

GRUPOS	TIPOS DE FIBRAS							
	ÁREA FG		ÁREA FOG		% FG		% FOG	
	Média	S.D.	Média	S.D.	Média	S.D.	Média	S.D.
GCP45	2685,8 ^b	365,1	1227,3 ^{ab}	131,2	48,48 ^b	25,6	50,45 ^a	24,0
GCP150	3488,1 ^b	193,9	1733,1 ^b	227,0	32,18 ^{ab}	12,1	64,82 ^a	8,2
GCN45	1085,2 ^a	256,3	659,8 ^a	82,5	16,06 ^a	18,9	78,18 ^a	23,5
GCN150	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

a e b – comparação entre os grupos , para cada tipo de fibra (vertical)

Os dados da TABELA 2 mostram que houve diferenças significantes:

- 1-) da área da fibra do Tipo FG entre o grupo GCN 45 com os demais grupos;
- 2-) da percentagem da fibra do Tipo FG entre os grupos GCP 45 e o GCN 45;

3-) da área das fibras do Tipo FOG entre os grupos GCP 150 e GCN 45.

Tabela 3. Área média (em μm^2), desvio padrão (S.D.) e percentagem dos diferentes tipos de fibras encontrados no músculo EDL dos animais dos Grupos de período 45 dias.

GRUPOS	TIPOS DE FIBRAS							
	ÁREA FG		ÁREA FOG		% FG		% FOG	
	Média	S.D.	Média	S.D.	Média	S.D.	Média	S.D.
GCN45	1085,2 ^a	256,3	659,8 ^a	82,5	16,06 ^a	18,9	78,18 ^a	23,5
GCP45	2685,8 ^b	365,1	1227,3 ^a	131,2	48,48 ^b	25,6	50,45 ^a	24,06
GEVV45	1454,4 ^{ab}	313,8	1052,5 ^a	376,3	16,82 ^{ab}	27,05	80,68 ^a	22,3
GEVG45	1405,6 ^{ab}	475,9	876,3 ^a	175,8	38,64 ^{ab}	29,2	59,82 ^a	28,2
GEVGL45	1762,6 ^{ab}	503,8	961,7 ^a	211,3	21,36 ^{ab}	14,9	77,91 ^a	12,8
GEVVL45	1578,9 ^{ab}	206,1	1129,8 ^a	198	27,45 ^{ab}	24,5	66,73 ^a	20,6

a e b – comparação entre os grupos , para cada tipo de fibra (vertical)

Os dados da TABELA 3 mostram que houve diferenças significantes:

1-) apenas na área e percentagem da fibra FG do GCP45 para o GCN45.

Tabela 4. Área média (em μm^2), desvio padrão (S.D.) e percentagem dos diferentes tipos de fibras encontrados no músculo EDL dos animais dos Grupos de período 150 dias.

GRUPOS	TIPOS DE FIBRAS							
	ÁREA FG		ÁREA FOG		% FG		% FOG	
	Média	S.D.	Média	S.D.	Média	S.D.	Média	S.D.
GCN150	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GCP150	3488,1 ^a	193,9	1733,1 ^a	227,01	32,18 ^a	12,1	64,82 ^a	8,2
GEVV150	3050,3 ^a	360,4	1701,3 ^a	485,3	26,36 ^a	20,5	58,27 ^a	28,5
GEVG150	2853,6 ^a	321,5	1794,4 ^a	328,05	25,68 ^a	30,9	64,66 ^a	39,04
GEVGL150	3373,1 ^a	504,5	1970,5 ^a	455,8	31,06 ^a	1,5	68,03 ^a	3,05
GEVVL150	2724,5 ^a	284,7	1663,4 ^a	50,2	20,11 ^a	11,8	71,59 ^a	3,1

a e b – comparação entre os grupos , para cada tipo de fibra (vertical)

Os dados da TABELA 4 mostram que, não houve diferenças significantes entre os grupos de período 150 dias, tanto na área quanto no percentual de fibras encontradas.

Dados sobre a área (μm^2) e a percentagem dos diferentes tipos de fibras comparando os grupos de período de 45 dias com os de 150 dias, estão representados na TABELA 5.

Tabela 5. Área média (em μm^2) e percentagem dos diferentes tipos de fibras encontrados no músculo EDL dos animais dos Grupos 45 e 150 dias.

GRUPOS	Área (μm^2)				Percentagem			
	FG		FOG		FG		FOG	
	(A ²)	SD	(A ²)	SD	(%)	SD	(%)	SD
GCP45	2685,9 ^{bc}	365	1227,3 ^{abcd}	131	48,48 ^b	25,6	50,45 ^a	24
GCN45	1085,3 ^{ac}	256	659,9 ^{ad}	82	16,06 ^a	18,9	78,18 ^{ab}	23,5
GEVV45	1454,5 ^{ac}	313	1052,5 ^{acd}	376	16,82 ^a	27	80,68 ^b	22,3
GEVVL45	1579,0 ^{ac}	206	1129,9 ^{abcd}	198	27,45 ^{ab}	24,5	66,73 ^{ab}	20,6
GEVG45	1405,7 ^{ac}	475	876,3 ^{acd}	175	39,64 ^{ab}	29,2	59,82 ^{ab}	28,2
GEVGL45	1762,7 ^{ac}	503	961,8 ^{acd}	211	21,36 ^{ab}	14,9	77,91 ^{ab}	12,8
GCP150	3488,2 ^b	193	1733,1 ^{bcd}	227	32,18 ^{ab}	12,1	64,82 ^{ab}	8,2
GCN150	---	---	---	---	---	---	---	---
GEVV150	3050,4 ^b	360	1701,4 ^{bcd}	485	26,36 ^{ab}	20,5	58,27 ^{ab}	28,5
GEVVL150	2724,6 ^b	284	1663,4 ^{bcd}	50,2	20,11 ^a	11,8	71,59 ^{ab}	3,1
GEVG150	2853,7 ^b	321	1794,4 ^{bd}	328	25,68 ^{ab}	30,9	64,66 ^{ab}	39
GEVGL150	3373,2 ^b	504	1970,6 ^b	455	31,06 ^{ab}	1,5	68,03 ^{ab}	3

a,b,c,d – comparação entre os grupos , para cada tipo de fibra (vertical). Letras iguais não apresentam diferença significativa estatisticamente.

Os dados desta tabela mostram que:

- Nas áreas das fibras FG entre os grupos:

- 1-) GCN45, GEVG45, GEVV45, GEVVL45, não há diferença significativa estatisticamente; GEVGL150, GEVG150, GEVV150, GEVVL150 e GCP45 e150, também não há diferença significativa, mas entre os quatro primeiros grupos 45 e os demais grupos há diferença significativa;
- 2-) GEVGL45 para os grupos GEVVL150, GEVG150, GEVV150, GEVGL150 e GCP150, há diferença significativa.

- Nas áreas das fibras FOG entre os grupos:

- 1-) GCN45, GEVG45 e GEVGL 45 não há diferença significativa estatisticamente entre eles; GEVVL 150, GEVV150, GEVG150, GEVGL150 e GCP150 não há diferença significativa estatisticamente entre eles; mas entre os grupos de 45 e 150 dias há diferença significativa entre eles;
- 2-) GEVV45 para os grupos GEVG150 e GEVGL150 há diferença significativa entre eles;
- 3-) GEVVL45 para o grupo GEVGL150 há diferença significativa entre eles;

- Nas percentagem entre os tipos de fibras:

- 1-) FG dos grupos GCN45, GEVV45 e GEVVL150 para o grupo GCP45 há diferença significativa ;
- 2-) FOG do grupo GCP45 para o grupo GEVV45 há diferença significativa entre eles.

Os dados comparando a área média (μm^2) em (%), das fibras dos tipos FG e FOG do músculo EDL, entre os vários grupos da pesquisa, estão representados na TABELA 6, evidenciando o volume da área e volume de perda das fibras musculares, respectivamente.

Para estes cálculos a área das fibras musculares dos GCP foram consideradas como 100%.

Tabela 6. Média da área das fibras (μm^2), percentagem da área e perda total dos diferentes tipos de fibras encontrada nos grupos.

GRUPOS	ÁREA FG			ÁREA FOG		
	Média (μm^2)	% (V) de área	%(V) de perda	Média (μm^2)	% (V) de área	% (V) de perda
GCP45	2685,9	100	0	1227,3	100	0
GCN45	1085,3	40	60	659,9	54	46
GEVV45	1454,5	54	46	1052,5	86	14
GEVG45	1405,7	52	48	876,3	71	29
GEVGL45	1762,7	66	34	961,8	78	22
GEVVL45	1579,0	59	41	1129,9	92	8
GCP150	3488,2	100	0	1733,1	100	0
GEVV150	3050,4	87	13	1701,4	98	2
GEVVL150	2724,6	78	22	1663,4	96	4
GEVG150	2853,7	82	18	1794,4	104	-4
GEVGL150	3373,2	97	3	1970,6	114	-14

Os dados da Tabela acima mostram que a maior redução na área das fibras musculares ocorreu no GCN aos 45 dias. Mas deve ser lembrado que no GCN150 a morfometria não pode ser realizada, mas que seguramente apresentaria resultados maiores. Nota-se também, que todos os grupos experimentais atingiram valores próximos ao do GCP e alguns até superando-o.

Nas reações de mATPase foram encontradas a presença de grupos de fibras de mesmo perfil fenotípico, denominada de “Type grouping”, como pode ser observadas nas Figura 8.

Figura 8. Fotomicrografia de reação mATPase pH4,55 evidenciando grupos de fibras de mesmo perfil fenotípico (círculo). Em A músculo EDL do grupo GEVG150. Em B músculo EDL do grupo GEVGL150.

As lâminas histológicas dos músculos EDL de todos os grupos foram coradas em HE, e estão representadas na Figura 9 para breve catalogação dos aspectos morfológicos das fibras musculares desnervadas e reinervadas.

Figura 9. Fotomicrografia dos músculos EDL corados em HE dos grupos desta pesquisa. GCN45 em A; GCN150 em B; GCP45 em C; GCP150 em D; GEVG45 em E; GEVG150 em F; GEVGL45 em 9G; GEVGL150 em H; GEVV45 em I; GEVV150 em 9J; GEVVL45 em K; GEVVL150 em L. Seta preta demonstra núcleo central; Seta verde demonstra fuso. Grupos de período 45 dias em (9-A,C,E,G,I,K). Grupos de período 150 dias em (9-B,D,F,H,J,L).

Nas lâminas coradas com HE (Fig. 9) pode se notar que nos animais dos GCN as fibras musculares não acompanharam o crescimento dos demais grupos, e esta diferença aumentou com o passar do tempo. Pode-se notar também que a quantidade de tecido conjuntivo (endomísio e perimísio) aumentou nos grupos GCN e continuou aumentando com o passar do tempo.

Apesar de não ter sido feito a morfometria, nas lâminas dos animais dos GCN pode-se observar também que o núcleo de algumas fibras musculares aumentou e deslocou-se para a parte central da mesma.

Nos animais dos grupos experimentais, nota-se também o deslocamento do núcleo para a parte central das fibras musculares, mas não ocorre um aumento com o passar do tempo. Quanto ao aumento da quantidade de tecido conjuntivo, nos animais destes grupos não foi observado, a olho nu, aumento da sua quantidade, quando comparado ao dos grupos GCP.

B-) Localização dos fatores de regulação miogênica MyoD e Miogenina por imunofluorescência.

Na reação de imunofluorescência para localização espacial da MyoD e Miogenina no músculo EDL de (*Ratus norvegicus*), visualizada em microscópio confocal foi possível observar a expressão de MyoD em todos os grupos, exceto no GCN45, e a expressão de Miogenina em todos os grupos exceto nos GCN150 e GEVG 150.

Nas Figuras 10 e 11 observa-se a identificação das expressões da MyoD e Miogenina.

Figura 10. Fotomicrografia mostrando a localização de Myod e núcleos (seta). Uma dupla marcação foi realizada para observar a localização de Myod (10A,D) e núcleo (10B,E) e as duas imagens sobrepostas mostrando a localização de Myod e núcleo. (10C,F). Indicadas pelas setas respectivamente. (A,B,C-GCF45) e (D,E,F-GEVV150).

Figura 11. Fotomicrografia mostrando a localização de Miogenina. Uma dupla marcação foi realizada para observar a localização de Miogenina (11A,D) e núcleo (11B,E) e as duas imagens sobrepostas mostrando a localização de Miogenina e núcleo (11C,F). Indicadas pelas setas respectivamente. (A,B,C-GEVV150) e (D,E,F-GCP45).

C-) Marcação de células apoptóticas.

Na realização da Imunohistoquímica para imunomarcacão de células ou corpos apoptóticos por meio da técnica de Tunel, e visualizada em microscópio óptico, foi possível encontrar marcações nos grupos GCN45 e 150, GEVG45 e 150, GEVGL 45 e 150, GEVV45 e 150 e GEVVL45, como pode ser observadas algumas marcações apoptose positiva nas fotomicrografias (Fig. 12).

Figura 12. Fotomicrografia das reações Imunohistoquímica para marcação de células em apoptose (setas). Células apoptóticas estão representadas em (12A) no grupo GCN45, em (12B) no grupo GCN150, em (12C) no grupo GEVG45 e em (12D) no grupo GEVVL45. Cabeças de setas representam núcleos normais.

Foi feita uma breve catalogação da área total por mm^2 do fragmento muscular, e a quantidade total de marcação de apoptose encontrada na reação destes músculos, descrita no (Quadro 2).

Quadro 2. Resultado da morfometria (mm²) do tecido muscular submetido à Imunohistoquímica de Tunel, verificando a quantidade de marcação de apoptose encontrada nesses tecidos.

GRUPO	Área (mm ²)	nº de marcação de apoptose
GCP45	3,55	0
GCN45	4,20	3
GEVGL45	2,89	3
GEVVL45	1,44	5
GEVV45	2,34	2
GEVG45	2,29	5
GCP150	6,47	0
GEVG150	4,48	2
GEVGL150	4,70	2
GCN150	1,32	7
GEVV150	5,48	1
GEVVL150	4,57	0

D-) Análise funcional do ciático.

Lembrando que, os valores próximos a -100 (cem) se referem a secção do nervo ciático, e valores próximos a 0 (zero) se referem a animais do grupo controle, como já descrito anteriormente. Os dados sobre a análise funcional do nervo periférico encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Análise funcional do nervo ciático, utilizando a equação de BAIN et al.,(1989), postas em ordem decrescente. (a,b,c,d) – comparação entre os grupos , para cada tipo de fibra (vertical). Letras iguais não apresentam diferença significativa estatisticamente.

Grupos	Valores das marchas	
	Média	S.D.
GEVVL45	-121,15 ^{acd}	13,64
GEVV45	-118,65 ^{acd}	25,40
GCN 45	-113,38 ^{abcd}	20,41
GEVG45	-107,55 ^{abcd}	31,21
GEVGL45	-72,02 ^{abcd}	13,59
GCP45	-42,27 ^{bd}	27,56
GEVVL150	-86,75 ^{abcd}	19,52
GCN150	-79,03 ^{abcd}	23,61
GEVG150	-71,14 ^{abcd}	5,45
GEVV150	-61,26 ^{abcd}	30,03
GEVGL150	-54,67 ^{bcd}	23,44
GCP150	-29,74 ^{ab}	10,95

A análise estatística realizada pelo teste “t student” dessas variáveis mostrou que os valores médios foram diferentes, havendo diferença estatisticamente significativa entre:

1-) os grupos GEVVL45 e GEVV45 para os grupos GEVGL150, GCP45 e GCP150;

2-) os grupos GCN45 e GEVG45 para os grupos GCP45 e GCP150;

3-) o grupo GEVVL150 e GCP150.

No grupo de 45 dias: o grupo que mais se aproximou do GCP45 foi o GEVGL45;

No grupo de 150 dias: o grupo que mais se aproximou do GCP150 foi o GEVGL150.

E-) PESO DOS ANIMAIS.

Os pesos médios, inicial e final, e ganho de peso em percentagem estão apresentados no Quadro 3, separados por períodos.

Quadro 3. Pesos médios, iniciais e finais, em gramas (g) e ganhos de peso em %, dos animais de todos os grupos usados no trabalho.

GRUPOS	peso inicial (g)	peso final (g)	percentual de ganho (%)
GCP45	265,6	351	32,15
GCN45	275	357,6	30,04
GEVV45	286,8	341	18,9
GEVVL45	277	334	20,58
GEVG45	297	357	20,2
GEVGL45	316	394	24,68
GCP150	266,6	514,4	92,95
GCN150	276,4	495,2	79,16
GEVV150	276,6	452	63,41
GEVVL150	308	445	44,48
GEVG150	279,1	414,2	48,41
GEVGL150	304	481	58,22

Com a média por percentagem do ganho de peso dos animais pode-se dizer que, os animais em período de 45 e 150 dias de todos os grupos tiveram ganho de peso.

Alguns animais dos Grupos controles negativos (um do GEGL150, um do GEVVL150, e dois do GCN150), realizaram autofagia nas patas dos membros pélvicos que foram realizadas as cirurgias (Fig. 13), roendo suas falanges. Estes animais não foram escolhidos para a realização da Análise funcional da Marcha, mas seus músculos se encontravam intactos, portanto foram aproveitados nas análises dos demais parâmetros.

Não foram observadas infecções ou reações inflamatórias, na face ventral do pescoço dos animais operados (local da retirada da veia), e na região dorsal do membro pélvico, local onde foi realizado lesão do nervo ciático.

Figura 13. Membro em que foi submetido a cirurgia, relatando autofagia de suas falanges. Em (13A) pata do rato do grupo GEGL150, (13B) pata do rato do grupo GEVVL150 e (13C) pata do rato do grupo GCN150.

Discussão

Apesar de não ser objetivo deste trabalho discutir o método empregado nesta pesquisa, acredita-se ser importante comunicar algumas observações que poderão facilitar o uso desta metodologia por outros pesquisadores.

Para este experimento, utilizou-se ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, que além de serem resistentes, são de fácil manipulação, apresentam baixo custo de manutenção (VITERBO et al. 1994a; BERTELLI et al. 1996) e tem sido modelo freqüentemente utilizado em estudos envolvendo lesões, reparações e regenerações de nervos periféricos (ITOH et al., 1996; MACKINNON et al. 1985), e em músculos desnervados (SCHMALBRUCH & LEWIS, 2000).

Com relação ao sexo, foi incluído apenas macho, pois estes não apresentam as variações de ritmos hormonais e circadianas, ou fatores parácrinos mais marcantes que ocorrem nas fêmeas (LINCOLN, 1980).

Fora usado animais jovens porque alguns estudos demonstraram em adultos, pequeno decréscimo na velocidade de regeneração nervosa, bem como na freqüência de brotamento axonais (LUNDBORG 1987; FAWCETT 1992).

Durante o procedimento cirúrgico estava sendo usada a metodologia descrita por Roque (2007) e Roque (2008), mas encontrou-se dificuldade na retirada da veia jugular externa porque a mesma era perfurada no momento da coleta. Para resolver este problema foi utilizado um fio ortodôntico inoxidável de 0,06mm dobrado, fazendo com que a ponta ficasse “romba” e não perfurasse a veia no momento de introduzi-lo à sua luz.

Quanto ao anestésico, o fármaco e a dose usada podem ser considerados adequados, pois em situações normais os animais permaneceram sedados por um período de quarenta a cinquenta minutos, e ocorreram apenas dois óbitos durante o procedimento cirúrgico, devido à necessidade de aplicação de dose extra nesses animais.

Nos estudos feitos por Histoquímica utilizando a técnica de mATPase ácida e alcalina, e NADH-Tr, deparou-se na dificuldade de se encontrar fibras do tipo SO nas amostras do músculo EDL, uma vez que este músculo é composto predominantemente de fibras de contração rápida, sendo encontrado cerca de 1-2% de fibras SO nesse tipo de músculo (JAWEED et al. 1955).

Os resultados desta pesquisa mostram que a desnervação aos 45 dias já causa diferenças significantes quanto à área e percentagem dos diferentes tipos histoenzimológicos de fibras musculares. Nas fibras do tipo FOG a diferença não é significativa, mas o valor está bem próximo. Esta alteração tem sido investigada por vários pesquisadores que confirmam esta atrofia, variando apenas a percentagem da redução, para alguns de 75 a 90% para outros (KNOWLTON e HINES, 1936), e para outros de 20 a 40% após 60 dias para alguns (SUNDERLAND e RAY, 1950).

Os dados observados mostram que os diferentes métodos de tubulização desta pesquisa tiveram resultados semelhante, entre si e com o grupo controle positivo, quando comparados nos mesmos período, mas nota-se uma tendência em melhores resultados na metodologia da combinação da gordura com o laser.

Quanto a interferência da desnervação na percentagem dos diferentes tipos de fibras, DAEMEN et al., (1998), afirmam que após 90 dias ocorre aumento na percentagem de fibra IIA (=FOG) por mm² e uma diminuição na percentagem da fibra IIB (=FG), e CEBASEK (2006) afirma que 28 dias após a ocorrência do fenômeno, a percentagem de fibras do tipo IIB do músculo EDL diminui. Estas informações coincidem com os dados desta pesquisa, desde o período de 45 dias após a desnervação do músculo EDL.

Na literatura consultada não foi encontrado referência quanto ao efeito da reinervação na percentagem dos tipos de fibras do músculo EDL, mas IJKEMA-PAASSEN (2001) trabalhando com músculos gastrocnêmio lateral e tibial anterior, que são músculos formados predominantemente por fibras de contração rápida como o EDL, afirmam que os valores tenderam a se aproximar do normal. Nesta pesquisa com o EDL de ratos os resultados obtidos com as diferentes técnicas de reinervação mostram resultados semelhantes entre si e aos obtidos por IJKEMA-PAASSEN (2002).

Um aspecto típico de regeneração muscular provocado por lesões de nervos periféricos, seguidas de reinervação, é um achado freqüente chamado de “type grouping”, onde grupos de fibras musculares ao receber sua nova inervação, ficam com características fenotípicas e metabólicas semelhantes entre si (KARPATI & ENGEL, 1968; BERTELLI et al. 1996). RAFUSE & GORDON (1996) sugerem que grupos de fibras de mesmo perfil fenotípico “type grouping” é explicado por haver brotamentos axonais distalmente que induz propriedades similares aos grupos de

fibras musculares adjacentes. Nas amostras musculares dos animais experimentais desta pesquisa o “type grouping” foi observado evidenciando que, ocorreu a regeneração neural, e esta conseguiu atingir seu órgão alvo que seria o músculo, e suas fibras musculares.

As fibras musculares atrofiam rapidamente nos períodos iniciais de desnervação, de forma que nos primeiros 60 dias a área de secção transversal média de uma fibra está reduzida em até 70%. O processo se faz mais lento após este período, avançando apenas mais 10% em 120 dias, e a partir deste momento a atrofia varia de 80 a 90% (SUNDERLAND e RAY, 1950). Estas informações são semelhantes aos dados encontrados nesta pesquisa, onde aos 45 dias após a desnervação as fibras musculares do tipo FG sofreram uma redução de 60%, e a fibra do tipo FOG sofrendo redução de 46% de sua área.

A literatura consultada informa que nas fibras dos músculos desnervados os núcleos se apresentam maiores e mais ovais a partir do 9º ao 16º dia, e persistem assim até que a atrofia das fibras esteja estabelecida, quando eles passam a apresentar sua forma alongada original (TOWER, 1935; BOWDEN e GUTMAN, 1944; ALTSCHUL, 1948; ADAMS et al., 1962; GUTMANN e ZELENÁ, 1962). Devido a atrofia muscular, vários núcleos se movem para o centro das fibras. Esta movimentação do núcleo é imposta para sua preservação (BOWDEN e GUTMANN, 1944). Estas mudanças não incluem todas as fibras musculares de maneira uniforme. O número de mionúcleos das fibras do músculo Sóleo de rato reduzem cerca de 43% em 10 semanas de desnervação, enquanto que no músculo Extensor Longo dos Dedos não é alterado (Schmalbruch e Lewis, 2000). Observações semelhantes foram notadas nesta pesquisa nas lâminas coradas com HE.

Na técnica de imunofluorescência para localização dos fatores de regulação miogênica Myod e Miogenina, não foi possível realizar uma tripla marcação em uma mesma reação, devido o uso de anticorpos policlonais primários contra, MyoD e miogenina, serem de coelho, e como o anticorpo secundário anti-coelho contém fluoresceína (no caso FITC ou PE) ocorreria uma reação cruzada. Por isso, as lâminas foram submetidas a reações de imunomarcação separadas, para cada anticorpo.

LAPALOMBELLA et al., (2008) em estudos com músculo Tibial Anterior desnervado durante um período duradouro de três a nove meses, encontraram

aumento de expressão das proteínas MyoD e Miogenina, concluindo que a regeneração da miofibrila é um mecanismo não compensatório, e que prolonga a chance de reinervação durante um período duradouro de desnervação. Na presente pesquisa também pode ser encontrada a expressão de MyoD e Miogenina no músculo EDL desnervado por longo período.

HUGHES et al., (1993) afirmaram que apesar de não existir uma correlação absoluta entre MyoD e miogenina, com os diferentes tipos de fibras, observa-se um predomínio de MyoD na região de fibras de contração rápida e de miogenina na de contração lenta. Eles mostraram também que a alteração dos diferentes tipos de fibras pela ação da inervação cruzada ou injeção de hormônios tireoidianos levam às alterações correspondentes de MyoD e miogenina. Nesta pesquisa a quantificação destas proteínas não foi estudada uma vez que o músculo EDL é predominante composto de fibras de contração rápida. Nesta pesquisa observou-se a presença de MyoD em todos os grupos exceto o GCN45, e a expressão de Miogenina em todos os grupos, exceto nos GCN150 e GEVG 150.

Quanto a apoptose, segundo RODRIGUES & SCHMALBRUCH (1995), relatam que não foi encontrada mionúcleos com cromatina condensada em músculo EDL com desnervação neonatal e houve falha na demonstração da quebra de DNA após 30 semanas de desnervação. Segundo estes autores a falha correu pelo fato deles terem usado a técnica ensaio cometa.

BORISOV & CARLSON (2000) afirmam que o número de TUNEL positivo morfológicamente intacto e núcleo fragmentado após 2 meses de desnervação, em ratos adultos, não excedeu de 7-12 por seções longitudinais no músculo TA, 5-9 no músculo EDL e 5-11 no músculo sóleo e permaneceu o mesmo nível em 4 meses de desnervação. Nenhuma reação positiva foi encontrada no músculo controle normal. Estes dados são semelhantes aos encontrados nesta pesquisa com o músculo EDL.

Quanto à avaliação funcional da marcha, os trabalhos de (DIJKSTRA et al., 2000; MEEK et al., 2001) mostram que gravações da marcha “footprint” e cálculo do índice funcional do isquiático (SFI) apenas apresentam uma recuperação mínima ao longo do tempo. Resultados similares foram obtidos por CHEN et al. (1994). Outros grupos de pesquisadores, entretanto, observaram alguma melhora em índices após 13 semanas (HALL & VAN WAY 1994) ou 26 semanas (MILEDI & SLATER 1970) respectivamente, e na pesquisa do autor (MEEK et al., 2001), os achados revelaram

uma pequena recuperação no aspecto qualitativo do modo de andar (como regularidade dos ciclos de passada, fluência de caminhada) com o tempo. Neste trabalho com vários grupos experimentais com tubulização do nervo ciático, também se notou uma melhora nos índices com o passar do tempo, mas o que apresentou melhor resultado foi o grupo GEVGL.

Apesar de não ser objetivo do trabalho, pode-se notar que as cirurgias não interferiram no desenvolvimento do peso dos animais em nenhum dos grupos, uma vez que o ganho de peso em % não mostrou diferença significativa estatisticamente entre nenhum dos grupos, nos períodos de 45 e 150 dias.

Quanto ao sucesso da cirurgia de desnervação, pode-se notar que alguns animais realizaram autofagia dos seus membros pélvicos do lado operando, provando a falta de sensibilidade nestas regiões, produzida pela secção do nervo ciático.

Conclusão

Baseado nos dados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que:

- a-) o tecido adiposo usado no preenchimento de veia na técnica de tubulização do nervo ciático interfere na recuperação do músculo EDL desnervando, aproximando-o mais do controle positivo;
- b-) o laser de baixa potência usado sobre a tubulização com veia do nervo ciático interfere na recuperação do músculo EDL desnervando, aproximando-o mais do controle positivo;
- c-) o uso do laser e do tecido adiposo, em conjunto, na técnica de tubulização do nervo ciático interfere na recuperação do músculo EDL desnervando, aproximando-o mais do controle positivo;
- d-) o uso do laser e do tecido adiposo, em conjunto, na técnica de tubulização do nervo ciático interfere na recuperação do músculo EDL desnervando, e foi a técnica que mais se aproximou do controle positivo;

Referências Bibliográficas

ADAMS, R. D.; DENNY-BROWN, D. & PEARSON C.M. *Diseases of Muscle*. London: Kimpton, 1962.

ALLEN, D.L.; MONKE, S.R.; TALMADGE, R.J.; ROY R.R.; EDGERTON, V.R. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol*. 78: 1969-1976. 1995.

ALTSCHUL, R. On nuclear proliferation and nuclear size. *Anat. Rec.*, 100,517, 1948.

ANZIL A.P. & WERNIG, A. Muscle fibre loss and reinnervation after long-term denervation. *J Neurocytol* 18: 833–845, 1989.

ARIANO, M.A.; ARMSTRONG, R.B.; EDGERTON, V.R. Hindlimb muscle fibre population of five mammals. *J. Histochem Cytochem*. 21:51-55, 1973.

ASSIA, E.; ROSNER, M.; BELKIN, M.; SOLOMON, A.; SCHWARTZ M. Temporal parameters of low energy laser irradiation for optimal delay of post-traumatic degeneration of rat optic nerve. *Brain Res*. 9;476(2):205-12, 1989.

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconst. Surg*. 83: 129-138, 1989.

BAXTER, G.D.; WALSH, D.M.; ALLEN, J.M.; LOWE, A.S.; BELL, A.J. Effects of low intensity infrared laser irradiation upon conduction in the human median nerve in vivo. *Exp Physiol*. 79(2):227-34, 1994.

BERTELLI, J.A.; SANTOS, A.R.S; CALIXTO, J.B. Is axonal sprouting able to transverse the conjunctival layers of the peripheral nerve? A behavioral, motor, and sensory study of the en-to-side nerve anastomosis. *J. Reconstr. Microsurg*. N.Y. 12: 559-563, 1996.

BIBIKOVA, A.; BELKIN, V.; ORON, U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. *Anat Embryol (Berl)*. 190(6):597-602, 1994.

BILLETER, R.; WEBER, H.; LUTZ, H.; HOWALD, H.; EPPENBERGER H.M. and JENNY E. Myosin types in human skeletal muscle fiber. *Histochem*. 65: 249-259, 1980.

BJUSZ, E. "Red" skeletal muscle fibers: relative independence of neural control. *Science* 145: 938–939, 1964.

BORISOV, A.B.; DEDKOV, E.; CARLSON, B.M. Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat Rec.*; 264: 203–18, 2001.

BOTTINELLI, R.; SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Force-velocity relationship and myosin heavy chain isoform composition of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J Physiol*. 437: 655-672, 1991.

BOWDEN, R. E. M. & GUTMANN, E. Denervation and re-innervation of human voluntary muscle. *Brain*, 67,273, 1944.

BROOKE, M.H. & KAISER, K.K. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol*. 23: 369-379, 1970.

BULLER, A.J.; ECCLES, J.C.; ECCLES, R.M. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses. *J. Physiol.(Lond)*. 150: 417-439, 1960.

CAIOZZO, V.J. Plasticity of skeletal muscle phenotype: mechanical consequences. *Muscle Nerve*. 26: 740-768, 2002.

CASTAÑEDA, F.; KINNE, R.K. Omental graft improves functional recovery of transected peripheral nerve. *Muscle Nerve*. Oct;26(4):527-32, 2002.

CEBASEK, V.; RADOCHOVÁ, B.; RIBARIE, S.; KUBÍNOVÁ, L.; ERZEN, I. Nerve injury affects the capillary supply in rat slow and fast muscles differently. *Cell Tissue Res*. 323: 305-312, 2006.

CHEN, L.E.; SEABER, A.V.; URBANIAK, J.R.; MURRELL, G.A.C. Denaturated muscle as a nerve conduit: a functional, morphologic and electrophysiologic evaluation. *J. Reconstr. Microsurg*. 10: 137-244, 1994.

COHN, A. et al. Acidentes de trabalho, uma forma de violência. Editora Brasiliense, 1985.

COLLS, J.C. La Terapia Laser hoy. Barcelona, 1984.

DAEMEN, M.A.R.C.; KURVERS, P.H.J.; BULLENS, D.W.; et al. Motor denervation induces altered muscle fibre type densities and atrophy in a rat model of neuropathic pain. *Neurosc. Letters*. 247: 204-208, 1998.

DEDKOV, E.I.; KOSTROMINOVA, T.Y.; BORISOV, A.B.; & CARLSON, B.M. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal population. *Anat. Rec*. 263: 139–154, 2001.

DEDKOV, E.I.; KOSTROMINOVA, T.Y.; BORISOV A.B.; CARLSON B.M.; Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. *Anat. Rec*. 263: 139-154, 2001.

DELHALLE, S.; DUVOIX, A.; SCHNEKENBURGER, M. MORCEAU, F. DICATO, M.; DIETERICH, M. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1010: 1-8, 2003.

DE MEDINACELI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking. *Tracks. Exp. Neural.* 77: 634-643, 1982.

DESCHENES, M.R.; MARESH, C.M.; & KRAEMER, W.J. Exercise training of moderate intensity does not abate the effects of denervation on muscle morphology. *Int. J. Sports Med.* 18: 426–430, 1997.

DIJKSTRA, J.R.; MEEK, M.F.; ROBINSON, P.H.; GRAMSBERGEN, A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *Neurosc. Methods.* 96: 89-96, 2000.

DOURADO, E.; DIAS, E.; CAUBI, A.F.; LAGO, C.; CAUÁS, M. Neurorrafia dos nervos periféricos associados com adesivo biológico. *Rev. de Cir. Buco-Maxilo-Facial. Recife.* 1(1): 41-45, 2001.

DUBOWITZ, V.; NEERUNJUN, J. Muscle transplantation in normal and dystrophic animals. *J. Physiol.* 231 – (2): p.61, 1973.

DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E.; HOULE, J.D.; GURLEY, C.M.; & PETERSON, C.A. Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 275: C1124–C1133, 1998.

FAWCETT, J.W. Intrinsic neuronal determinants of regeneration. *TINS, Barking.* 15(1): 5-8, 1992.

FAWCETT, J.W. & KEYNES, R.J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. *J. Neurosurg.*, 65: 354-63, 1986.

FERRARI, F.; RODRIGUES, A. C.; MALVEZZI, C. K.; SILVA, M. D. P.; PADOVANI, C. R. Inside-out vs. Standard Vein Graft to Repair a Sensory Nerve in Rats. *The Anatomical Record.* 256:227-232, 1999.

FIELDS, R.D.; LE BEAU, J.M.; LONGO, F.M. & ELLISMAN, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Progr. Neurobiol.*, 33: 87-137, 1989.

GENOVESE, W.J. Laser de baixa intensidade: Aplicações terapêuticas em Odontologia. São Paulo: Louise, 2000.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; ROCHKIND, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: A review of the literature. *Muscle Nerve*. 1-8, 2005.

GONYEA, W.J. AND ERICSON, G.C. Morphological study and histochemical organization of the flexor carpi radialis muscle in the cat. *Am J Anat*. 148: 329-344, 1977.

GRECO, M.; GUIDA, G.; PERLINO, E.; MARRA, E.; QUAGLIARIELLO, E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Biophys Res Commun*. 29;163(3):1428-34, 1989.

GUDA, C.M.H.; PIETER, J.K. & RICHARD, P.D. Vein graft conduits versus conventional suturing in peripheral nerve reconstructions. *Microsurgery*, 14: 584-588, 1993.

GUTMANN, E.; ZELENÁ, J. Morphological changes in the denervated muscle. In *The denervated muscle*. GUTMANN E, ed, pp 341–71. Prague Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague. 1962.

HALL, G.D.; VAN WAY, C.W. A comparison of nerve grafting and tissue expansion techniques in the rat. *Microsurgery*. 15: 439-442, 1994.

HAMILTON, G.F.; ROBISON, T.K.; RAY, R.H. The effect of helium-neon laser upon regeneration of the crushed peroneal nerve. *JOSP*, 15(5): 209-214, 1992.

HESS, A.; ROSNER, S. The satellite cell bud and myoblast in denervated mammalian muscle fibers. *Am J Anat.*, 129: 21-39, 1970.

HUDSON, A.R.; HUNTER, D.; KLINE, D.G. et al. Histological studies of experimental interfascicular graft repair. *J. Neurosurg.*, 51: 333-340, 1979.

HUGHES, S.M.; TAYLOR, J.M.; TAPSCOTT, S.J.; GURLEY, C.M.; CARTER, W.J.; PETERSON, C.A. Selective accumulation of MyoD and Myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervations and hormones. *Development*. 118: 1137-1147, 1993.

HYATT, J.P.; ROY, R.R.; BALDWIN, K.M.; AND EDGERTON, VR. Nerve activity independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285: C1161–C1173, 2003.

IJKEMA-PASSEN, J.; MEEK, M.F.; GRAMSBERGEN, A. Reinnervation of muscles after transaction of the sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve*. 25: 891-897, 2002.

IJKEMA-PASSEN, J.; MEEK, M.F.; GRAMSBERGEN, A. Muscle differentiation after sciatic nerve transaction and reinnervation in adult rats. *Ann Anat.* 183: 369-377, 2001.

IRINTCHEV, A.; DRAGUHN, A.; AND WERNIG, A. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation. *Neuroscience*. 39 (1): 231- 243, 1990.

ISHIDO, M.; KAMI, K. & MASUHARA, M. In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287: C484–C493, 2004.

ISHIHARA, A.; ROY, R.R.; OHIRA, Y.; IBATA, Y. & EDGERTON, V.R. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. *J Appl Physiol* 84: 2183–2189, 1998.

ITOH, S.; SHINOMIYA, K.; SAMEJIMA, H.; OHTA, T.; ISHIZUKI, M.; ICHINOSE, S.. Experimental study on nerve regeneration through the basement Membrane tubes of the nerve, muscle, and artery. *Microsurgery*. 17: 525-534, 1996.

JAWEED, M.M.; HERBISON, G.J.; DITUNNO, J.F. Denervation and reinnervation of fast and slow muscles- a histochemical study in rats. *The J. of Histochem. and Cytochem.*, 23(11): 808-827, 1955.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. Histologia Básica. Guanabara Koogan. 9 ed. 1999.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B*. Mar;27(3):219-23, 1995.

KARPATI, G.; ENGEL, W.K. "Type grouping" in skeletal muscles after experimental reinnervation. *Neurology*. 18: 447-455, 1968.

KERR, J.F. WYLLIE, A.H. CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 26: 239-257, 1972.

KINGHAM, P.J.; BIRCHALL, M.A.; RACHEL BURT, R.; JONES, A. and TERENCE, G. Reinnervation of laryngeal muscles: a study of changes in myosin heavy chain expression. *Muscle Nerve* 32: 761–766, 2005.

KNOWLTON, G. C.; & HINES, H. M. Kinetics of muscles atrophy in different species. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*; 35,394, 1936.

KOISHI, K.; ZHANG, M.; McLENNAN, I.S.; HARRIS, A.J. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neutrally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. *Dev. Dyn.* 202(3): 244-254, 1995.

KOLARI, P.J. Penetration of unfocused laser light into the skin. *Arch Dermatol Res*, 277(4):342-4, 1985.

LANDER, A.D.; FUJII, D.K. & REICHARDT, L.F. Laminin is associated with the “neurite outgrowth-promoting factors” found in conditioned media. *Proc. Natl. Sci. USA*. 82: 2183-2187, 1985.

LAPALOMBELLA, R.; KERN, H.; ADAMI, N.; BIRAL, D.; ZAMPIERI, S.; SCORDARI A.; di TULLIO S.; MARINI M. Persistence of regenerative myogenesis en spite of down-regulation of activity-dependent genes in long-term denervated rat muscle. *Neurological Research*. 30 (2): 197-206, 2008.

LECH, O. Principios básicos. In PARDINI A.G.Jr. Cirurgia da mão: lesões não traumáticas. Rio de Janeiro: Medsi, p.1-33, 1990.

LEVIN, S.A. Toxicologic pathologist's view of apoptosis or I used to call it necrobiosis, but now I'm singing the apoptosis blues. *Toxicol. Pathol.* 23: 533-539, 1995.

LINCOLN, G.A.; SHORT R.V. Seasonal breeding nature's contraceptive. *Reprod. Prog. Horm. Res. N.Y.*, 36: 1-52, 1980.

LU, D.X.; HUANG, S.K.; CARLSON, B.M. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec* 248: 355–365, 1997.

LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair – A review. *Acta Orthop. Scand. Oslo*, 58: 145-169, 1987.

MACKIN, E.J. & BYRON, P.M. Reabilitação da mão: Organização de um Centro de Terapia da mão. In: PARDINI A.G. Jr. Cirurgia da mão. São Paulo: Editora Medsi, 1990.

MACKINNON, S.E.; DELLON, A.L.; HUDSON, A.R.; HUNTER, D.A. Nerve regeneration through a pseudosinovial sheath in a primate model. *Plast. Reconst. Surg. Baltimore*, 75(6): 833-841, 1985.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis, an overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146: 3-15, 1995.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 493-495, 1961.

McCOMAS, A.J. Skeletal muscle: form and function. Champaign, IL. 1996.

McGEACHIE, J.K. Sustained cell proliferation in denervated skeletal muscle of mice. *Cell Tissue Res.* 257: 455-457, 1989.

MEEK, M.F.; VAN DER WERFF, J.F.A.; NICOLAI, J-P.A.; GRAMSBERGEN A. Biodegradable p(DLLA-CL) nerve guides versus autologous nerve grafts: EMG and video analysis. *Muscle Nerve.* 24: 753-759, 2001.

MEGENEY, L.A.; RUDNICKI, M.A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem. Cell Biol.* 73(9-10): 723-32, 1995.

MILEDI, R.; SLATER, C.R. On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *J. Physiol.(Lond)*. 207: 507-528, 1970.

MILLES, H. Peripheral nerve injuries.. Nerve sutures and nerve injuries. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.*, 19:25-37, 1982.

MINELLA, L.S. Diferenças de enfoque sobre os acidentes de trabalho e suas contribuições teórico-metodológicas. *Ver. Bras. de Saúde Ocupac.* 78 (21): 51-60, 1993.

MOLKENTIN, J.D.; BLACK, B.L.; MARTIN, J.F. OLSON, E.N. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell*. 83(7): 1125-36, 1995.

MURRAY, M.A. & ROBBINS, N. Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells. *Neuroscience* 7: 1823–1833, 1982.

MURRAY, M.A. & ROBBINS, N. Cell proliferation in denervated muscle: time course, distribution and relation to disuse. *Neuroscience* 7: 1817–1822, 1982.

OLIVEIRA, E.F.; MAZZER, N. et al. The use of a muscle graft to repair a segmentary nerve defect. An experimental study using the sciatic nerve of rats as model. *J. Neurosc. Methods*. 133 (1-2): 19-26, 2004.

OLSON, J.E.; SCHIMMERLING, W.; TOBIAS, C.A. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res*. 12;204(2):436-40, 1981.

PADYKULA, H.A. & HERMAN, E. The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem*. 3: 170-195, 1955.

PELLEGRINO, C. & FRANZINI, C. An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibres. *F. Cell Biol.*, 17, 327, 1963.

PERNET, A. Lições de cirurgia da mão. Editora Manole. São Paulo, 1977.

PETTE, D.; VRBOVÁ, G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 120: 116-202, 1992.

PETTE, D. & STARON, R.S. Transitions of muscle fiber phenotypics profiles. *Histochem Cell Biol*. 115: (5)359-372, 2001.

PETTE, D. & STARON, R.S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fiber. *Rev. Physio. Biochem. Pharmacol*. 116: 1-76, 1990.

PETER, J.B.; BARNARD, R.J.; EDGERTON, V.R.; GILLESPIE, C.A.; STEMDEL, K.E. Metabolic profiles of the three fiber types of the skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*. 11: 2627 –2633, 1972.

PETTE, D.; PEUKER, H.; STARON, R.S. The impact of biochemical methods for single muscle fiber analysis. *Acta Physiol. Scand*. 166: 261-277, 1999.

RANTANEN, J.; HURME, T.; LUKKA, R.; HEINO, J.; KALIMO, H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab. Invest*. 72(3): 341-347, 1995.

RANVIER, L. Note sur les vaisseaux sanguins et la circulation dans les muscles rouge. *C.R. Soc. Biol*. 26:28-31, 1874.

RAFUSE, V.F.; GORDON, T. Self-reinnervated cat medial gastrocnemius muscle. II. Analysis of the mechanisms and significance of fiber type grouping in reinnervated muscles. *J. Neurophysiol*. 75: 282-297, 1996.

REDDY, G.K.; GUM, S.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA C.S. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part II. Effects of combined laser therapy and electrical stimulation. *Med Sci Sports Exerc*. Jun;30(6):794-800, 1998.

REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med*. 22(5):281-7, 1998.

REICHMANN, H. & PETTE, D. A comparative microphotometric study of succinate dehydrogenase activity levels in type I, IIA and IIB fibres of mammalian and human muscle. *Histochem*. 74: 27-41, 1982.

ROCHKIND, S.; BARRNEA, L.; RAZON, N.; BARTAL, A.; SCHWARTZ, M. Stimulatory effect of He-Ne low dose laser on injured sciatic nerves of rats. *Neurosurgery*. Jun;20(6):843-7, 1987.

ROCHKIND, S.; NISSAN, M.; BARR-NEA, L.; RAZON, N.; SCHWARTZ, M.; BARTAL, A. Response of peripheral nerve to He-Ne laser: experimental studies. *Lasers Surg Med*. 7(5):441-3, 1987.

ROCHKIND, S.; NISSAN, M.; LUBART, R.; AVRAM, J.; BARTAL, A. The in-vivo-nerve response to direct low-energy-laser irradiation. *Acta Neurochir (Wien)*. 94(1-2):74-7, 1988.

ROCHKIND, S.; NISSAN, M.; RAZON, N. SCHWARTZ, M.; BARTAL, A. Electrophysiological effect of HeNe laser on normal and injured sciatic nerve in the rat. *Acta Neurochir (Wien)*.83(3-4):125-30, 1986.

RODRIGUES, A.C.; SCHMALBRUCH, H. Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. *Anat Rec*.,243:430-437, 1995.

RODRIGUES, A.C.; DOLFINI, M.I.M.; GEUNA, S.; ANDREO, J.C.; RODRIGUES, S.P.M. Apoptosis in long-term denervated rat skeletal muscle. *Braz. J. Morphol. Sci*. 22(4): 151-156, 2005.

ROQUE, D.D. **Enxerto venoso ao avesso e normal, com ou sem preenchimento de músculo, em regeneração nervosa de ratos**. 2008. 129f. Tese (Doutorado em bases gerais de cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ROQUE, J.S. **Enxertos venosos ao avesso e normal, preenchidos com plasma rico em plaquetas em nervo misto de rato**. 2007. 138f. Tese (Doutorado em bases gerais de cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ROSSER, B.W.; DEAN, M.S.; BANDMAN, E. Myonuclear domain size varies along the lengths of maturing skeletal muscle fibers. *Int J Dev Biol.*, 46:747-754, 2002.

ROY, R.R.; MEADOWS, I.D.; BALDWIN, K.M. & EDGERTON, V.R. Functional significance of compensatory overloaded rat fast muscle. *J Appl Physiol.*, 52: 473–478, 1982.

SCHIAFFINO S.; REGGIANI C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* 76: 371-423, 1996.

SCHMALBRUCH, H.; LEWIS, D.M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve.* 23:617-626, 2000.

SCHULTZ, E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 175: 84–94, 1996.

SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD S. A. Human skeletal fiber type classifications. *Physical Therapy.* 81(11): 1810-1816, 2001.

SEDDON, H.J. Three types of injury. *Brain, Eynsham.* 66(4): 237-288, 1943.

SNOW, M.H. A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. *Anat Rec* 207: 593–604, 1983.

STARON, R.S. Human skeletal muscle fiber types: delineation, development and distribution. *Can J Appl Physiol.*, 22(4): 307-327, 1997.

SUNDERLAND, S.; RAY L.J. Denervation changes in mammalian striated muscles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 13: 159–77, 1950.

SUNDERLAND, S. Capacity of reinnervated muscle to function efficiently after prolonged denervation. *Archs Neurol. Psychiat.*, Chicago, 64, 755, 1950.

SUNDERLAND, S. Nerves and nerves injuries. *Edinburg, Churchill Livingstone*. 483-650, 1978.

TERZIS, J.; FAIBISOFF, B. & WILLIAMS, H.B.; The nerve gap, suture under tension versus graft. *Plastic. Reconstr. Surg.*, 56: 166-70, 1975.

TOMANEK, R. J. & LUND, D. D. Degeneration of different types of skeletal muscle fibres. *I. Denervation. F. Anat.*, 116,395, 1973.

TOWER, S. S. Atrophy and degeneration in skeletal muscle. *Am. F. Anat.*, 56 (1), 1935.

VALENTINI, R.F.; AEBISCHER, P.; WINN, S.R. & GALLETTI, P.M. Collagen-and laminin-containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. *Exp. Neurol.*, 98: 350-356, 1987.

VEÇOSO, M.C. Laser em fisioterapia. São Paulo: Lovise Cientifica, 1993.

VIGUIE, C.A.; LU, D.X.; HUANG, S.K.; RENGGEN, H.; AND CARLSON B.M.; Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. *Anat Rec.*, 248: 346–354, 1997.

VITERBO, F.; TRINDADE, J.C.; HOSHINO, K.; NETO, A.M. Endo-to-side neurorrhaphy with removal of epineural sheath, na experimental study in rats. *Plast. Reconst. Surg. Baltimore*, 94: 1038-1047, 1994a.

VOYTIK, S.L.; PRZYBORSKI, M.; BADYLAK, S.F. & KONIECZNY, S.F.; Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. *Dev. Dyn.*, 198: 214–224, 1993.

WALKER, J.B. Akhanjee LK. Laser-induced somatosensory evoked potentials: evidence of photosensitivity in peripheral nerves. *Brain Res.* Oct 7;344(2):281-5, 1985.

WALLER, A.V. Experiments on the section of glossofaryngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* (London) 140: 423-429, 1850.

WALSH, D.M.; LOWE, A.S & BAXTER, G.D. An investigation on the effect of 820nm laser irradiation upon nerve conduction in the frog. *Sciatic nerve victor, Irish Journal of Medical Science.* 24: 23-24, 1995.

WALTERS, E.H.; STICKLAND, N.C. & LOUGHNA, P.T.; The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil.*, 21: 647–653, 2000.

WALTON, R.L.; BROWN, R.E.; MATORY, W.E.; Jr. BORAH, G.L. & DOLPH, J. L.. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. *Plast. Reconstr. Surg.*, 84: 944-952, 1989.

WANG, K.K.; COSTAS, P.D.; BRYAN, D.J.; JONES, D.S. & SECKEL, B.R.; Inside-out vein graft promotes improved nerve regeneration in rats. *Microsurgery.* 14: 608-618, 1993.

WEISS, A.; SCHIAFFINO S. AND LEINWAN L.A. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications to functional diversity. *J. Mol. Biol.*, 290: 61-75, 1999.

WEINSTEIN, S.M.; HERRING, S.A. Nerve problems and compartment syndromes in the hand, wrist and forearm. *Clin. Sport Med. N. Y.* 11(1): 161-188, 1992.

WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Will it be possible to produce peripheral nerves? *Surg. Technol. Int.* San Francisco, 11: 303-310, 2003.

WOLEDGE, R.C.; CURTIN, N.A.; HOMSHER, E. Energetic aspects of muscle contraction. *Monogr. Physiol. Soc.*, 41:1-357, 1985.

YABLONKA-REUVENI, Z.; RIVERA, A.J. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev. Biol.* 164(2): 588-603, 1994.

YAMASITA, A.C. **AFNP- Análise funcional dos nervos periféricos. Desenvolvimento de um software flexível no estudo de regeneração periférica.** 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da USP.

YOSHIMURA, K.; HARII, K. A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. *J. Surg. Res.*, 81: 139–146, 1999.

YOSHITANI, M.; FUKUDA S.; ITOI S.; MORINO S.; TAO H.; NAKADA A. et al. Experimental repair of phrenic nerve using a polyglycolic acid and collagen tube. *J Thorac Cardiovasc. Surg.* 133(3):726-32, 2007.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.*, 19: 124-128, 2004.