UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANDRÉ LUIS SHINOHARA

**Células satélites e fusos neuromusculares em músculos estriados
de ratos desnervados por longo período**

BAURU
2012

ANDRÉ LUIS SHINOHARA

**Células satélites e fusos neuromusculares em músculos estriados
de ratos desnervados por longo período**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

VERSÃO CORRIGIDA

BAURU
2012

Sh63c Shinohara, André Luis
Células satélites e fusos neuromusculares em
músculos estriados de ratos desnervados por longo
período / André Luis Shinohara. – Bauru, 2012.
87 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Doutorado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

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

Assinatura:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 022/2009

A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca
da Faculdade de Odontologia de Bauru – *FOB/USP*.

DEDICATÓRIA

DEDICO ESTA TESE

À Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e professores pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS

Simplesmente Obrigado Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me suprir em todas as minhas necessidades e pelo espetáculo emocionante de viver AVIDA. A mais linda de todas as viagens e que deve ter cada segundo muito bem vivido para honra e gloria de Deus.

À MINHA ESPOSA RAQUEL

Pelo amor, apoio, compreensão e que sempre me estimula a crescer científica e pessoalmente e acima de tudo, pelo inestimável apoio familiar que preencheu as diversas falhas que fui tendo por força das circunstâncias, e pela paciência e compreensão reveladas ao longo destes anos. Te amo.

À MINHA FILHA SOPHIA

Que tanto amo e que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fizeram entender que o futuro, é feito a partir da constante dedicação no presente e pela compreensão e ternura sempre manifestadas apesar da falta da minha atenção e ausências.

AOS MEUS PAIS, YASSUO E TAIKO

Que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo, meus mais profundos agradecimentos e o meu muito obrigado pela compreensão quanto ao afastamento e ausência em determinados momentos.

À MINHA IRMÃ ANA

Por todo apoio e incentivo na conquista desta nova etapa.

AO MEU SOBRINHO GABRIEL

Pelos momentos de descontração e alegria proporcionando situações agradáveis em minha vida.

AOS MEUS SOGROS, IVETE E VANDE

Por sempre me estimular a não desistir de meus sonhos e por contribuir para o meu crescimento profissional, pessoal e por serem também um exemplo a ser seguido.

A MINHA CUNHADA ROBERTA

Pelo apoio em todos os momentos de dificuldades e por muitas vezes me fazer rir.

AO MEU ORIENTADOR E AMIGO PROFESSOR DR. ANTONIO DE CASTRO RODRIGUES (TOM)

Muito obrigado por tudo. Palavras não são suficientes para expressar meus sinceros agradecimentos a esta maravilhosa pessoa, que considero não somente um orientador profissional, mas também um grande amigo e porque não dizer um irmão mais velho, sendo um exemplo de pessoa e profissional em minha vida.

AOS PROFESSORES JESUS CARLOS ANDREO E ROGÉRIO LEONE BUCHAIM

Obrigado por tudo, pela confiança, apoio, amizade, orientação, valiosos ensinamento e pelos momentos de descontração que nos leva a confirmar que podemos nos divertir mesmos nos momentos mais difíceis.

AO PROFESSOR JOÃO LOPES TOLEDO FILHO

Pelo apoio, amizade e ensinamento, meu muito obrigado.

AO AMIGO E PROFESSOR DR. MILTON CARLOS KUGA

Que me fazer rir, que me orienta profissionalmente, pelo exemplo de pessoa amiga e honesta e acima de tudo por me ajudar e muito na conquista de meus sonhos.

AOS FUNCIONARIOS DO DEPARTAMENTO DE ANATOMIA: ROMÁRIO, ORIVALDO, CISIRA (IN MEMMORIAN), DANIELA E LORISVALDA (LORI).

Obrigado por toda ajuda, respeito e carinho.

AOS MEUS QUERIDOS AMIGOS: VILELA, ALESSANDRA E CLAUDIO E DANI E ALEXANDRE.

Meu muito obrigado por toda amizade, apoio e incentivo.

À AMIGA CARINA GUIMARÃES DE SOUZA MELO

Companheira de curso e incansáveis viagens a Maringá, obrigado por toda ajuda e incentivo e pelos momentos de muita comédia ao lembrar-nos de inesquecíveis situações em nossa jornada estudantil.

TO MY FRIENDS FAROOQUE JAMALUDDIN AHMED

Thanks you for the friendship and help.

TODOS VOCÊS SÃO COAUTORES DESTE TRABALHO!

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP)**, por todo apoio, infraestrutura e ensino educacional.

À **Capes**, pelo apoio financeiro possibilitando a realização deste curso com muito mais tranquilidade.

Aos amigos de turma do Doutorado: **Gabriela, Elcia e Maria Cecília**, pelo companheirismo e ajuda nas exigentes aulas da pós-graduação.

Aos alunos e estagiários do departamento de anatomia: **Letícia, Daniel, Geraldo, Gustavo, Daniela Buchaim, Jéssica, Cleuber, Juninho e Mizael**, pela ajuda nas atividades desenvolvidas no departamento.

Ao professor **Dr. José Roberto Pereira Lauris**, pela ajuda no tratamento estatístico deste trabalho.

A todos os **professores do departamento de ciências biológicas**, por todo ensinamento e orientação.

A **coordenadoria do curso de pós-graduação**, pelo apoio no decorrer do desenvolvimento desta tese.

Aos **funcionários da secretaria de pós-graduação**, pela disponibilidade e paciência no decorrer deste período.

Aos **funcionários do biotério central**, pela ajuda no tratamento aos animais durante o período experimental deste trabalho.

À **secretária Vera Lúcia**, secretária do departamento de ciências biológicas, por todo carinho, prestatividade, ajuda, apoio e conhecimento administrativo durante a realização deste Doutorado.

As funcionárias da limpeza **Creuza e Cícera**, sem elas, as atividades práticas de cirurgia seria muito mais difícil e estressante.

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho e que acreditaram e confiaram em mim, me apoiando e torcendo pelo meu Sucesso.

Meu muito obrigado!

Oração ao Cadáver Desconhecido

"Ao curvar-te com a lâmina rija de teu bisturi sobre o cadáver desconhecido, lembra-te que este corpo nasceu do amor de duas almas; cresceu embalado pela fé e esperança daquela que em seu seio o agasalhou, sorriu e sonhou os mesmos sonhos das crianças e dos jovens; por certo amou e foi amado e sentiu saudades dos outros que partiram, acalentou um amanhã feliz e agora jaz na fria lousa, sem que por ele tivesse derramado uma lágrima sequer, sem que tivesse uma só prece. Seu nome só Deus o sabe; mas o destino inexorável deu-lhe o poder e a grandeza de servir a humanidade que por ele passou indiferente."

Karl Rokitansky (1876)

Ao cadáver, respeito e agradecimento

RESUMO

O músculo estriado esquelético apresenta em sua constituição células satélites (CS) que se encontram em estado quiescente localizadas entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares. As CS podem ser ativadas, diferenciando em mioblastos, contribuindo para regeneração e/ou crescimento do tecido muscular. Os Fusos neuromusculares são mecanorreceptores localizados no interior dos músculos esqueléticos considerados a unidade contrátil reguladora, monitorando a velocidade e duração do alongamento do músculo. Está composto de fibras intrafusais (FIF), circundadas por uma bainha de tecido conjuntivo e encontra-se paralelo às fibras extrafusais. A desnervação promove alterações no músculo esquelético, tanto em CS, quanto nos fusos neuromusculares. Este trabalho analisou quantitativamente as FIF e a proliferação de CS em músculos esquelético de ratos desnervados por longo período. Foram utilizados ratos Wistar. Os animais foram divididos em grupos desnervados e controle. Os músculos Sóleo e Extensor longo dos dedos (EDL) foram desnervados experimentalmente. Após os períodos de 0, 12, 16, 19, 30 e 38 semanas, os músculos foram dissecados, removidos e preparados histologicamente. A porcentagem de CS em músculos imediatamente após desnervação aumenta em relação ao músculo normal e depois decresce em ambos os músculos. Durante o progresso do tempo de desnervação ocorreu um aumento no número de FIF, se comparado com o grupo normal. O número de CS diminui significativamente entre os períodos de desnervação, em ambos os grupos. Nos músculos estudados quanto menor a porcentagem de CS maior é o número de FIF e, aumentando o tempo de desnervação, diminui o número de CS. Em relação às FIF, no grupo controle com o aumento do tempo, o número de fibras não se altera. Já para o grupo experimental, com o aumento do tempo de desnervação, diminui o número de CS e aumenta o número de FIF significativamente. Concluímos então que nos músculos desnervados por longo período ocorre diminuição na porcentagem de células satélites e aumento no número de FIF. Finalmente nossos resultados sugerem que entre 16^a e 19^a semana pós-desnervação encontra-se o melhor período para reinervação de um músculo desnervados.

Palavras Chaves: Células Satélites do musculo esquelético. Fusos neuromusculares. Denervação.

ABSTRACT

Satellite cells and neuromuscular spindles in skeletal muscles in long term denervated rats

The skeletal muscle consists of satellite cells (SC) which are in a quiescent state located between the sarcolemma and basal lamina of the muscle fibers. The SC can get activated, differentiating into myoblasts, contributing to regeneration and/or growth of muscle tissue. The neuromuscular spindles are mechanoreceptors located within the skeletal muscle and are considered as contractile regulatory unit, monitoring the speed and duration of muscle stretching. It is composed of Intrafusal muscle fibers (FIF), surrounded by a sheath and is parallel to extrafusal fibers. Denervation cause changes in skeletal muscles both in the CS and neuromuscular spindles. This study analyzed quantitatively the FIF and the proliferation of CS in rat skeletal muscle, denervated for long period. We used Wistar rats to perform this study. The animals were divided into control and denervated groups. The soleus and extensor digitorum longus (EDL) were denervated experimentally. After periods of 0, 12, 16, 19, 30 and 38 weeks, the muscles were dissected, removed and were prepared for histological analysis. The percentage of SC in muscles immediately after denervation, increases in relation to normal muscle and later decreases in both the groups. During the process of denervation, there was an increase in FIF when compared with normal group. The number of SC reduces significantly between the periods of denervation in both the groups. In the muscles studied, the smaller the percentage of SC, higher is the number of FIF and increase in the duration of denervation, reduces the number of SC. As for FIF, with the increase in time in control group, the number of fibres was unaltered. However, in the experimental group, with increase in the time of denervation, the number of SC decreases while there is increase in the number of FIF significantly. We thus conclude that in denervated muscles for long period, there is decrease in the percentage of satellite cells and increase in FIF. Finally our results suggest that the period between 16th and 19th week of post denervation is the best time for reinnervation of denervated muscle.

Keywords: Satellite cells of skeletal muscle. Neuromuscular spindles. Denervation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS:

- Figura 1** - A: Célula Satélite e B: Mionúcleo Normal. 29
- Figura 2** - Ativação, diferenciação e proliferação de células satélites na resposta a injúria muscular. Vários fatores liberados pelo exercício ou lesão ativam as células satélites fazendo com que estas deixem o estado quiescente. Neste estado as células podem proliferar e/ou migrar, nesse caso ao fundir-se aos miócitos “danificados”, contribuem para a regeneração da célula (adaptado de HAWKE e GARRY, 2001). 30
- Figura 3** - A: Estrutura do fuso neuromuscular e B: Imagem histológica de um fuso neuromuscular. 31
- Figura 4** - Fibras intrafusais e fibras nervosas de um fuso neuromuscular. 32
- Figura 5** - Reflexo de estiramento. 34
- Figura 6** - Técnica Cirúrgica. A: animas em caixa plásticas, B e D: Tricotomia, C: Microscópio Cirúrgico, E: Nervo Isquiático dissecado, F e G: Secção de 10 mm do nervo. 44
- Figura 7** - Dissecção e coleta dos músculos estudados. 45
- Figura 8** - Software Image Pro-Plus 6.0. 47

APÊNDICE:

- Apêndice 1** - Carta do parecer da Comissão de Ética e Pesquisa em animas da FOB/USP. 87

GRÁFICOS:

Gráfico 1 - Porcentagem de CS no músculo Sóleo.	51
Gráfico 2 - Porcentagem de CS no músculo. EDL.	51
Gráfico 3 - Número de FIF no músculo Sóleo.	52
Gráfico 4 - Número de FIF no músculo EDL.	52
Gráfico 5 - Correlação da % de CS e nº de FIF dos grupos controles no músculo Sóleo.	53
Gráfico 6 - Correlação da % de CS e nº de FIF dos grupos desnervados no músculo Sóleo.	53
Gráfico 7 - Correlação da % de CS e nº de FIF dos grupos controles no músculo EDL.	55
Gráfico 8 - Correlação da % de CS e nº de FIF dos grupos desnervados no músculo EDL.	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Divisão dos grupos.	44
TABELA 2. Comparação entre grupos e tempos (Análise de variância a 2 critérios e Teste de Tukey).	54
TABELA 3. Coeficiente de correlação de Pearson com as respectivas significâncias para o número de Células Satélites (CS) relacionados números de Fibras intrafusais (FIF) dos músculos Sóleo e EDL no Grupo Controle.	56
TABELA 4. Coeficiente de correlação de Pearson com as respectivas significâncias para os diferentes TEMPOS de experimentais relacionados aos números de Células Satélites (CS) e número de Fibras intrafusais (FIF) dos músculos Sóleo e EDL no Grupo Controle.	56
TABELA 5. Coeficiente de correlação de Pearson com as respectivas significâncias para os diferentes TEMPOS de experimentais relacionados aos números de Células Satélites (CS) e número de Fibras intrafusais (FIF) dos músculos Sóleo e EDL no Grupo desnervado.	57
ANEXO 1. Tabela da Descrição dos grupos.	83

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1. <i>Músculo Estriado Esquelético</i>	25
2.2. <i>Células Satélites</i>	28
2.3. <i>Fusos Neuromusculares</i>	30
2.4. <i>Desnervação</i>	34
2.5. <i>Células Satélites e Fusos Neuromusculares na Desnervação</i>	35
3. PROPOSIÇÃO	37
3.1. <i>Objetivo Geral</i>	39
3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	39
4. MATERIAS E MÉTODOS	41
4.1. <i>Técnica Cirúrgica</i>	43
4.2. <i>Coleta das Amostras</i>	45
4.3. <i>Preparo Histológico e Coleta de Dados</i>	45
4.4. <i>Tratamento Estatístico</i>	47
5. RESULTADOS	49
5.1. <i>Análise Quantitativa</i>	51
5.2. <i>Análise Estatística</i>	52
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	81
APÊNDICE	85

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O músculo estriado esquelético tem sido objeto de estudos e pesquisas associadas a diferentes campos do conhecimento. Patologias de diversas ordens podem acometer este tecido e têm-se aumentado o interesse por sua organização estrutural e funcional.

Os núcleos das fibras dos músculos estriados esqueléticos são numerosos podendo em fibras com alguns centímetros de comprimento existir centenas de mionúcleos. Os mionúcleos apresentam-se de forma alongada sempre com seu maior eixo na direção do maior eixo da fibra muscular. Sua posição pode variar dependendo do tipo de músculo e espécie de animal, muito embora na maioria dos músculos estriados esqueléticos de mamíferos adultos localizarem-se na periferia das fibras imediatamente abaixo do sarcolema.

Todos os músculos estriados esqueléticos apresentam células satélites. As células satélites são pequenas células miogênicas, em estado quiescente localizadas entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares. Durante a vida extrauterina estas células permanecem em estado de repouso (quiescente), porém dependendo de certos estímulos, como o miotrauma, elas são ativadas, ou seja, sintetizam diversas proteínas que contribuem para modificar o status desta célula. A partir daí elas podem se diferenciar em mioblastos, dividir-se, migrar e fundir-se, contribuindo assim para a regeneração e/ou crescimento do tecido muscular (RODRIGUES et al., 2002; HILL e GOLDSPIK, 2003; PARTRIDGE, 2003; ANDERSON, 2006; BECCAFICO et al., 2007; TAJIKA et al., 2007).

Postula-se que essas células são protagonistas no processo de reconstituição do tecido muscular lesionado. Rupturas do sarcolema induzem a migração dessas células até a região lesionada onde elas podem fundir-se as fibras musculares ainda viáveis ou posicionar-se no tecido se diferenciando em células precursoras de células musculares denominadas mioblastos. A fusão da célula satélite com a consequente cessão de seu núcleo permite um aumento na síntese de proteínas aumentando as chances de recuperação desta célula. Por sua vez a diferenciação em mioblastos contribui com o aparecimento de novas fibras preenchendo e recuperando a região lesionada (VITELLO et al., 2004; DREYER et al., 2006; BAKER et al., 2007; MCFARLAND et al., 2007).

Os músculos esqueléticos possuem dois tipos de receptores sensoriais: Órgão tendinoso de golgi e Fuso neuromuscular (GUYTON e HALL, 2006), os quais são sensíveis à distensão e à tensão (MACARDLE et al., 1998). A modificação das fibras musculares em relação à tensão e comprimento são os principais parâmetros físicos da atividade muscular, que são percebíveis através do sistema proprioceptivo localizado em músculos e tendões (BAGRICHEVSKY, 2001).

Os fusos neuromusculares são mecanorreceptores que se encontram localizados entre as fibras musculares esqueléticas (BANI e BERGAMINI, 2002). O fuso neuromuscular é o principal órgão sensitivo do ventre muscular, é considerado a unidade contrátil reguladora do músculo e é composto de fibras intrafusais (FIF), circundadas por uma bainha de tecido conjuntivo, contendo líquido em seu interior que ficam paralelas à fibra extrafusar (FEF). O fuso está ligado às fibras extrafusais, assim quando o músculo é alongado ocorre também o alongamento do fuso. O processo de excitação do fuso neuromuscular ocorre quando um estímulo de alongamento é aplicado.

O fuso neuromuscular destaca-se por monitorar a velocidade e duração do alongamento e detecta as alterações no comprimento do músculo. As fibras do fuso neuromuscular são sensíveis à rapidez com a qual um músculo é alongado (ALTER, 1999).

Métodos para observar o comportamento estrutural do músculo estriado esquelético têm sido utilizados nestas últimas décadas, em particular técnicas de desnervação. Várias pesquisas foram realizadas, tais como análise morfológica e morfométrica de músculos esqueléticos em diversos períodos pós-desnervação, observações da proliferação das células satélites e mionúcleos e apoptose de fibras musculares (RODRIGUES e SCHMALBRUCH, 1995; RODRIGUES et al., 2002; RODRIGUES et al., 2006a; RODRIGUES et al., 2006b; RODRIGUES et al., 2007; DAVATZ et al., 2007; MORGUETE et al., 2007).

A desnervação promove alterações no músculo esquelético, fato que pode ser observado pela diminuição do trofismo, aumento do tecido gorduroso e do tecido conjuntivo no músculo acometido (MINAMOTO, 2007; RODRIGUES et al., 2007).

Quando há lesão do músculo esquelético, uma série de processos resulta no reparo tecidual. A lesão muscular pode levar à inflamação, ativação das células satélites, miogênese, proliferação dos fibroblastos, reorganização do tecido conjuntivo e matriz extracelular (MINAMOTO, 2007).

Músculos de contração lenta, como o Sóleo, quando submetidos à desnervação, apresentam atrofia muscular mais proeminente do que em músculos de contração rápida, como o Extensor longo dos dedos (EDL) (RODRIGUES et al., 2002).

Esta atrofia decorrente da desnervação que afeta tanto fibras musculares lentas quanto rápidas, resulta na diminuição do diâmetro da fibra muscular e da força muscular. Além disso, a transição dos tipos de fibras musculares no sentido de lenta para rápida leva ao aumento da velocidade de contração muscular, com consequente diminuição da capacidade de gerar força (MINAMOTO, 2007).

Alguns autores documentaram um aumento significativo de células satélites logo após a desnervação (MURRAY e ROBBINS 1982; MCGEACHIE, 1989), porém outros trabalhos demonstram que imediatamente após a desnervação a população de células satélites parece não se alterar, contudo, após 30 dias de desnervação diminuem em relação aos mionúcleos (SNOW, 1983; RODRIGUES et al., 2002).

O comportamento dos fusos neuromusculares em músculos desnervados em longo período ainda não foi estudado. Somente RODRIGUES e SCHMALBRUCH (1995) e LU et al. (1997) estudaram a ultraestrutura de músculo desnervado por longo período sem caracterizar os fusos. Como também, nada se sabe da correlação entre células satélites e fusos neuromusculares.

Com o objetivo de colaborar no entendimento dos fenômenos decorrente da desnervação, em músculos estriados com características morfológicas diferentes, ou seja, o músculo Sóleo que é um músculo de contração lenta e o músculo EDL que é um músculo de contração rápida, foi realizada a desnervação experimental dos referidos músculos em ratos, por um longo período de tempo.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Músculo Estriado Esquelético*

O músculo estriado esquelético é constituído por células cilíndricas denominadas fibras musculares. Essas fibras são finas, longas e multinucleadas. Estão dispostas paralelamente uma as outras, com a força de contração direcionada ao longo do eixo longitudinal (MCARDLE et al., 2003).

A célula muscular estriada é altamente especializada na capacidade de transformar energia química em energia mecânica (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As fibras musculares são delimitadas por uma delgada membrana denominada sarcolema, que envolve o sarcoplasma, que é o citoplasma da fibra. As fibras musculares estriadas possuem estrias transversais em todo seu comprimento e são constituídas de miofibrilas dispostas longitudinalmente umas ao lado das outras. Entre as miofibrilas encontramos uma substância denominada sarcoplasma, que contém organelas citoplasmáticas como mitocôndrias e retículo sarcoplasmático (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A função muscular é realizar o encurtamento das fibras, resultando em tração sobre os ossos ou outros elementos nas quais as duas extremidades estão inseridas. Durante a contração as fibras são encurtadas e o músculo torna-se mais espesso como um todo (ROMER e PARSONS, 1985).

No músculo as fibras estão organizadas em grupos de feixes envolvidas em uma camada de tecido conjuntivo, o epimísio. Dele parte septos de tecido conjuntivo, que se direcionam ao interior do músculo, separando os feixes. Estes septos são denominados perimísio e envolvem cada feixe de fibra muscular. Cada fibra muscular é envolvida pela lâmina basal da fibra muscular e por fibras reticulares de endomísio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As miofibrilas preenchem quase que totalmente a fibra muscular. Ao microscópio óptico aparecem as estrias transversais, pela alternância de faixas claras e escuras. A faixa escura e anisotrópica recebe o nome de banda A, enquanto a faixa clara e isotrópica recebe o nome de banda I, entretanto no centro da banda I aparece uma linha transversal escura, a linha Z. As estrias das miofibrilas são

observadas devido a repetições de unidades iguais de sarcômeros. Os sarcômeros compõem basicamente de dois filamentos um delgado (actina) e o outro espesso (miosina) (FERREIRA, 2005).

As miofibrilas do músculo estriado contem quatro proteínas principais: miosina, actina, tropomiosina e troponina. A miosina e actina juntas representam 55% do total das proteínas do músculo estriado. O filamento fino se insere na linha Z com a participação da proteína α -actina, dirigindo-se medialmente, mas sem atingir o centro do sarcômero. Este filamento fino é composto por monômeros globosos de uma proteína chamada actina. Estes monômeros se polimerizam em cadeias que se enrolam em dupla-hélice as quais se associam as proteínas tropomiosina e troponina. Os filamentos grossos são constituídos por feixes de moléculas protéicas fibrilares de miosina que estão no centro do sarcômero, mas sem atingir lateralmente as estrias Z (CLARK et al., 2002).

As moléculas de miosina são constituídas por dois longos polipeptídios enrolados que assumem a forma de bastão longo com duas cabeças globulares em uma de suas extremidades (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Quando o músculo está em repouso, a tropomiosina está em íntimo contato com a actina, cobrindo esta molécula e impedindo o contato entre a actina e miosina. Contudo, quando o músculo é estimulado, o aumento da permeabilidade induzido pelo estímulo na membrana celular se transmite ao retículo endoplasmático liso, que libera no citosol íons de cálcio no seu interior (GEEVES e HOLMES, 1999).

Os íons na troponina promovem uma mudança na conformação molecular resultando na separação entre tropomiosina e actina. Este movimento molecular expõe os agrupamentos de actina que reagem com as cabeças de miosina, estabelecendo pontes de contato entre os dois filamentos. Assim o encurtamento da cabeça globular da miosina, consome energia do ATP, desloca o filamento de actina, encurtando o sarcômero e consequentemente ocasionando o encurtamento da fibra muscular, resultando na contração (GEEVES e HOLMES, 1999).

A circulação no músculo traz substâncias nutritivas e oxigênio às células musculares, que através da energia química os transformam em energia cinética e calor, resultando na contração, além de dissipar os resíduos metabólicos (BROOKS, 2003). A extensa rede dos vasos sanguíneos garante suprimento a cada fibra muscular, seja na necessidade de sangue oxigenado, ou na remoção de dióxido de

carbono. As artérias e veias estão paralelamente às fibras musculares formando uma extensa rede dentro e ao redor do endomísio (MCARDLE et al., 2003).

Um conjunto de um neurônio motor e das fibras musculares por ele inervados é denominado de unidade motora. A unidade motora é a unidade funcional do movimento (MCARDLE, 2003). A quantidade de fibra muscular inervada por uma fibra nervosa é variável (GEEVES e HOLMES, 1999).

A composição química do músculo esquelético estriado é de 75% de água, 20% de proteínas e os 5% restantes de sais e outras substâncias como fosfatos de alta energia, uréia e lactato. Dentro da composição proteica a miosina representa 55%, a actina e a tropomiosina são proteínas bastante abundantes. (MCARDLE, 2003).

O tecido conjuntivo no músculo desempenha um papel de conduzir os vasos sanguíneos, penetrando e estendendo, conduzindo nervos que inervam as fibras musculares. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1998). O tecido conjuntivo é caracterizado morfológicamente por apresentar células especializadas imersas em abundante quantidade de matéria intercelular: substância intercelular amorfa, fibras colágenas, elásticas e reticulares. O seu papel principal é proporcionar suporte mecânico aos órgãos e manter a integridade estrutural das várias unidades anatômicas e funcionais do ser (MOREIRA e CARVALHO, 1996).

O músculo esquelético pode ser classificado como músculo de contração rápida ou de contração lenta. Assim o músculo Sóleo é classificado como músculo de contração lenta, e o músculo EDL como um músculo de contração rápida.

O músculo gastrocnêmico contém uma mistura de fibras de contração rápida e lenta. As fibras rápidas e lentas podem ser distinguidas pelas atividades das enzimas nas vias metabólicas oxidativas e glicolíticas. Na maioria das fibras rápidas as atividades das enzimas glicolíticas são elevadas e as atividades das enzimas oxidativas são baixas. Essas características se correlacionam com o número de mitocôndrias presentes na fibra (BERNE et al., 2004).

Como as fibras rápidas dependem do metabolismo glicolítico, elas entram em fadiga rapidamente. Em contraste, as fibras lentas satisfazem as demandas metabólicas com a fosforilação oxidativa. Consequentemente, esses músculos entram em fadiga mais lentamente e, por isso, são usados mais para atividades de sustentação.

Algumas fibras rápidas têm tanto a capacidade glicolítica como a oxidativa elevadas, mas são incomuns em humanos (BERNE et al., 2004).

O músculo esquelético exibe considerável plasticidade fenotípica. O crescimento normal está associado com a hipertrofia celular causada pela adição de mais miofibrilas e mais sarcômeros nas extremidades da célula para igualar o crescimento do esqueleto.

2.2.Células Satélites

A musculatura esquelética de mamíferos adultos possui grande capacidade de adaptação a demandas fisiológicas, como no crescimento, no treinamento e no trauma. Sendo as fibras musculares esqueléticas adultas caracteristicamente bem diferenciadas, esse elevado potencial adaptativo é atribuído a uma população de células residentes no músculo esquelético adulto, denominadas *células satélites*.

As células satélites musculares foram inicialmente descritas em 1961 em fibras musculares de rato (MAURO, 1961). Elas fazem parte de uma população de células com grande atividade mitogênica que contribuem para o crescimento muscular pós-natal, o reparo de fibras musculares danificadas e a manutenção do músculo esquelético adulto. Foram assim denominadas por sua localização anatômica na periferia de fibras musculares multinucleadas maduras entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares (Figura 1). São células indiferenciadas e mononucleadas, cuja membrana basal está em continuidade com a membrana basal da fibra muscular. Enquanto o tecido muscular esquelético mantém-se livre de agressões, as células satélites permanecem em estado de quiescência (repouso).

Entretanto, em resposta a estímulos como crescimento, remodelação ou trauma, as células satélites são ativadas, proliferam-se e expressam marcadores da linhagem miogênica. Neste estado, também são denominadas mioblastos. Essas células se fundem a fibras musculares já existentes ou se fundem a células satélites vizinhas para gerar novas fibras musculares. Há evidências de que as células satélites constituem uma população bastante heterogênea, visto que algumas podem sofrer diferenciação imediata, sem divisão prévia, enquanto outras

primeiramente proliferam, gerando uma célula filha para diferenciação e outra para futura proliferação (RANTANEN et al., 1995).

Estudo demonstrou que apenas 50% das células satélites que proliferam entram em fase final de diferenciação, expressando a proteína miosina do desenvolvimento (YABLONKA-REUVENI e RIVERA, 1994).

Figura 1 - A: Célula Satélite e B: Mionúcleo Normal.

É sabido que as células satélites são responsáveis pela adição de novos mionúcleos em fibras musculares em desenvolvimento ou que estejam em processo de regeneração (Figura 2).

Com relação à distribuição das células satélites foi observado que podemos encontrá-las como constituintes normais de todos os músculos estriados esqueléticos de vertebrados independentemente da idade, tipo de fibra ou localização. As células satélites constituem cerca de 30% dos mionúcleos das fibras musculares em animais recém-nascidos sendo que este número diminui com o aumento da idade (MAZANET e FRANZINI-ARMSTRONG, 1986).

Morfologicamente, as células satélites quiescentes diferem das ativadas por apresentarem alta relação núcleo/citoplasma, com poucas organelas, núcleo menores quando comparado com os núcleos adjacentes da fibra muscular e aumento da heterocromatina nuclear comparada à do mionúcleo. Quando ativadas, ocorre redução da heterocromatina, aumento na relação citoplasma/núcleo e aumento no número de organelas intracelulares (SCHULTZ e MCCORMICK, 1994).

Estudos mostram as células satélites como células pleomórficas com um ou ambos os polos ramificados, às vezes de maneira bastante complexa (SCHMALBRUCH, 1978). Em estudos com cultura de células, observou-se que as células satélites humanas movimentam-se e apresentam uma taxa constante de migração (CHAZAUD et al., 1998).

Alguns estudos sugerem que as células satélites são derivadas de células pluripotenciais de origem não somática, como as células endoteliais (DE ANGELIS et al., 1999). Contudo, a origem das células satélites ainda não está definida. Há uma hipótese de que elas se originem de células pluripotenciais da mesoderme dos somitos (HAWKE e GARRY, 2001).

Fonte: HAWKE e GARRY, 2001

Figura 2 - Ativação, diferenciação e proliferação de células satélites na resposta a injúria muscular. Vários fatores liberados pelo exercício ou lesão ativam as células satélites fazendo com que estas deixem o estado quiescente. Neste estado as células podem proliferar e/ou migrar, nesse caso ao fundir-se aos miócitos “danificados”, contribuem para a regeneração da célula.

2.3. Fusos neuromusculares

Os músculos esqueléticos possuem uma grande variedade de receptores. Um deles é particularmente importante para o controle motor: os Fusos neuromusculares (GUYTON e HALL, 2006).

Os fusos neuromusculares são mecanorreceptores que se encontram localizados entre as fibras musculares esqueléticas (BANI e BERGAMINI, 2002). Possuem um formato fusiforme e são compostas de quatro a cinco fibras musculares

denominadas fibras intrafusais (FIF). São circundados por uma bainha de tecido conjuntivo, contendo líquido em seu interior. Esta bainha isola mecanicamente as FIF das fibras musculares esqueléticas, que são denominadas fibras extrafusais (FEF) (MACARDLE et al., 1998; DANTAS, 1999; HAMILL e KNUTZEN, 1999; POWERS e HOWLEY, 2000; BAGRICHEVSKY, 2001; CAMPOS e NETO, 2004).

Dentro de cada cápsula de cada fuso existem dois tipos especializados de FIF: as fibras nucleares tipo bolsa (FNB) e as fibras nucleares em cadeia (FNC). As FNB são grandes em diâmetro e contêm numerosos núcleos aglomerados na sua parte central. Já as FNC estão aderidas à superfície das FNB, e contêm muitos núcleos ao longo de seu comprimento (KUCERA, 1977a; KUCERA, 1977b; DESAKI e NISHIDA, 2006). Nas extremidades das FIF existem filamentos de actina e miosina capazes de realizar contração (MACARDLE et al., 1998; HAMILL e KNUTZEN, 1999; POWERS e HOWLEY, 2000) (Figura 3).

Fonte: http://aprendizagemcontrolomotor.blogspot.com/2010_11_01_archive.html.

Acesso em: 12 mar 2012

Figura 3 – A: Estrutura do fuso neuromuscular e B: Imagem histológica de um fuso neuromuscular.

Um Fuso neuromuscular adulto contém em média duas Fibras Nuclear tipo Bolsa (FNB) e duas de Fibras Nuclear em Cadeia (FNC) (MILBURN, 1973). Os fusos são controlados por dois tipos de fibras nervosas: aferentes sensoriais e eferentes motoras (DESAKI, 2001). A fibra nervosa anuloespirada (Ia) é aferente primária e fica entrelaçada ao redor da região central da FNB. Esta fibra responde diretamente à distensão (estiramento) do fuso, sendo seu grau de ativação proporcional ao seu grau de distensão. As terminações tipo raminho de flores (II) são um segundo tipo de fibras nervosas aferentes e fazem conexão principalmente com as FNC e são menos

sensíveis à distensão em relação às anuloespiradas (MACARDLE et al., 1998; HAMILL e KNUTZEN, 1999; POWERS e HOWLEY, 2000). (Figura 4).

Fonte: http://www.disfuncaoimiccional.med.br/nb-profissionais_fuso_muscular.html.
Acessado em: 12 mar 2012

Figura 4 - Fibras intrafusais e fibras nervosas de um fuso neuromuscular.

A ativação destes sensores nervosos transmite o impulso até a medula espinhal, ativando os motoneurônios referentes ao músculo distendido, induzindo a contração desse mesmo músculo, que ao encurtar o seu diâmetro reduz os estímulos de distensão provenientes dos fusos (MACARDLE et al., 1998; HAMILL e KNUTZEN, 1999; POWERS e HOWLEY, 2000).

Os Neurônios Motores podem ser divididos em dois tipos: alfa (α) e gama (γ). Os motoneurônios γ são menores que os α , e ambos inervam os fusos neuromusculares nas regiões polares das fibras intrafusais, onde estão localizados os elementos contrácteis. Os motoneurônios γ modulam a frequência de despolarização das fibras aferentes dos fusos. Elas são ativadas pelos centros superiores do cérebro, tendo como função manter o fuso em funcionamento, regulando seu comprimento e sua sensibilidade (MACARDLE et al., 1998; HAMILL e KNUTZEN, 1999; POWERS e HOWLEY, 2000).

A inervação eferente dos Fusos neuromusculares, através dos motoneurônios γ , determina a sua sensibilidade ao estiramento. Quando as fibras musculares extrafusais contraem, as fibras aferentes do fuso neuromuscular diminuem ou até param a frequência de despolarização. Isso faz com que o Sistema nervoso central (SNC) deixe de receber informação sobre o comprimento muscular. Este efeito pode

ser contrariado através da ativação dos motoneurônios γ pelo SNC (GUYTON e HALL, 2006).

A estimulação elétrica do córtex motor conduz tipicamente à ativação simultânea dos motoneurônios α e γ – Coativação alfa-gama. A ativação dos motoneurônios γ provoca a contração das regiões polares das Fibras Intrafusais, uma vez que a região central tem poucas proteínas contrácteis. Assim, a coativação alfa-gama permite que os Fusos neuromusculares acompanhem o encurtamento das Fibras Extrafusais, o que facilita os reflexos miotáticos (HOSPOD et al., 2007).

A fibra nervosa aferente Ia sai do núcleo das fibras musculares intrafusais e dirige-se à medula. Lá, faz conexão com motoneurônios alfa que saem da medula para inervar fibras extrafusais do mesmo músculo de onde partiu a fibra Ia (músculo homônimo). Essa conexão possibilita uma "excitação autogênica" para a contração do "músculo homônimo". Um único aferente Ia pode enviar terminais a vários motoneurônios alfa.

O aferente Ia que fez conexão com o motoneurônio alfa que inerva fibras do músculo homônimo também se liga aos motoneurônios alfa que inervam músculos sinérgicos, isto é, com função semelhante à do músculo homônimo. Isso reforça a ação.

Além de estar em conexão com o motoneurônio alfa que inerva o músculo homônimo e com outro neurônio alfa que inerva o músculo sinergista, o aferente Ia também se conecta com um pequeno neurônio intermediário (chamado interneurônio inibidor Ib); este, por sua vez, faz contato com o motoneurônio alfa que inerva o músculo antagonista ao movimento que se está construindo. Isso impede que ocorra um movimento contrário

Contudo, a função do fuso neuromuscular, segundo POWERS e HOWLEY (2000), é auxiliar na regulação do movimento e na manutenção da postura, detectando e informando ao SNC às alterações do comprimento das fibras musculares esqueléticas através do reflexo do estiramento. Para MCARDLE et al. (1998) a funcionalidade do fuso reside na sua capacidade de identificar, responder e controlar as mudanças no comprimento das FEF (Figura 5).

Fonte: http://www.fisfar.ufc.br/v2/graduacao/arquivo_aulas/org_sist_motor_geane.pdf
Acesso em: 12 mar 2012

Figura 5 - Reflexo de estiramento.

2.4.Desnervação

A desnervação promove alterações em estruturas de sustentação do material proteico e dos sarcômeros, os envoltórios de tecido conjuntivo (BENDALL et al., 1967). A desnervação também promove alterações no músculo esquelético, tais como diminuição do trofismo, aumento do tecido gorduroso e de tecido conjuntivo (KERN et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002).

A inervação é fundamental para a manutenção das propriedades e plasticidade dos diferentes tipos de fibras musculares (SCHIAFFINO et al., 1999). Em estudo prévio com o músculo Sóleo, após 30 dias de desnervação, comprova que a diminuição da atividade provoca alteração da fibra no sentido lenta para rápida (LIEBER, 2002).

Outra alteração encontrada no tecido muscular após a desnervação é a atrofia da fibra (IJKEMA-PAASSEN et al., 2004; FERNANDES et al., 2005). A atrofia decorrente da desnervação afeta tanto fibras musculares lentas quanto rápidas, resultando em diminuição do diâmetro da fibra muscular. Além disso, a transição dos tipos de fibras musculares no sentido de lenta para rápida leva ao aumento da

velocidade de contração muscular, com consequente diminuição da capacidade de gerar força (LIEBER, 2002; MINAMOTO, 2007).

A desnervação de músculos esqueléticos promove o aumento da densidade do tecido conjuntivo (RODRIGUES et al., 2002; FERNANDES et al., 2005). A resposta do tecido conjuntivo à desnervação promove a proliferação e síntese de componentes da matriz extracelular, onde durante o reparo celular ocorre aumento da síntese de colágeno tipo III e de alguns fibroblastos (BAZIN et al., 1964). O aumento da densidade de área do tecido conjuntivo após desnervação ocorre principalmente no endomísio e perimísio (MINAMOTO, 2007).

Finalmente, são encontradas alterações nas células satélites de músculos desnervados, como diminuição do tamanho da célula, do núcleo, da densidade de cromatina e da atividade celular, com consequente diminuição da capacidade regenerativa do músculo (RODRIGUES et al., 2002; KUJAWA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; MINAMOTO, 2007).

2.5.Células Satélites e Fusos neuromusculares na Desnervação

As fibras musculares estriadas esqueléticas desnervadas atrofiam e degeneram eventualmente elas morrem e são substituídas por novas fibras as quais novamente degeneram (SCHMALBRUCH et al., 1991b).

Em músculo de rãs as fibras musculares desnervadas por quase 4 anos desaparecem totalmente (ANZIL e WERNIG, 1989). Isto tem sido atribuído à exaustão do “pool” de células satélites no processo de regeneração.

Métodos para observação da proliferação das células satélites têm sido utilizados nestas últimas décadas, em particular técnicas de desnervação. SNOW (1983) observou que imediatamente após desnervação a população de células satélites parece não se alterar, porém após 30 dias de desnervação a porcentagem de células satélites em relação aos mionúcleos aumenta significativamente. Outros investigadores documentaram um aumento significativo de células satélites logo após a desnervação (McGEACHIE e ALLBROOK, 1978; MURRAY e ROBBINS, 1982; McGEACHIE, 1986).

Os resultados indicam que a proliferação de células satélites e a habilidade das fibras musculares para se regenerarem é nervo dependente.

As células satélites apresentam um único núcleo e localiza-se entre a lâmina basal e o sarcolema das fibras intra e extrafusais (SHUMALBRUCH, 1978).

Em 1961 KATZ observou células intimamente associadas com fibras musculares intrafusais. Posteriormente no mesmo ano, MAURO descreveu o mesmo tipo de célula relacionada com fibras extrafusais às quais ele denominou células satélites.

O comportamento dos fusos neuromusculares em músculos desnervados tem sido alvo de alguns estudos como de KUCERA (1977), SEKIYA et al. (1986) e OVALLE et al. (1999).

Em 1957 ZELENÁ em seu trabalho relata que em músculo esquelético de ratos recém-nascidos os fusos neuromusculares sofrem alterações com estrutura atípica em um curto período de tempo.

RODRIGUES e SCHMALBRUCH (1995), LU et al. (1997) estudaram a ultraestrutura de músculo desnervado por longo período sem caracterizar os fusos. A desnervação do músculo EDL de ratos por um período longo de tempo também foi estudado, porém quantificando somente as fibras musculares (VIGUIE et al., 1997), contudo, o que acontece com os fusos neuromusculares e em longo período de tempo pós-desnervação ainda não foi estudado.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

3.1. *Objetivo Geral*

Em vista do exposto, o alvo deste trabalho foi de analisar quantitativamente as fibras intrafusais dos fusos neuromusculares e a frequência de células satélites em músculos Sóleo e EDL de ratos desnervados por longo período de tempo.

3.2. *Objetivo Específico*

Nos músculos estriados esqueléticos (Sóleo e EDL) de ratos desnervado e não desnervado por longo período de tempo, analisar:

- 1.** O número de fibras intrafusais dos fusos neuromusculares
- 2.** A frequência de células satélites
- 3.** A correlação entre a porcentagem de células satélites, o número de fibras intrafusais nos diferentes tempos experimentais.

Material e Métodos

Foram utilizados 72 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos com peso corpóreo entre 180 e 200g (90 dias de vida). Estes animais foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP, sendo este projeto aprovado pela comissão de ética no ensino e pesquisa em animais da FOB/USP (CEEPA-Proc. Nº 022/2009 – ANEXO A).

4.1.TÉCNICA CIRURGICA

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Cloridrato de Quetamina (Dopalen®) associado ao Cloridrato de Xilazina (Anazedan®) na dosagem de 0,1ml/100g de massa corporal. Para todos os procedimentos cirúrgicos técnicas assépticas foram adotadas.

Inicialmente foi realizada a tricotomia da face lateral da coxa direita de cada animal. Feito isto, através de uma incisão iniciada entre o túber isquiático e o trocanter maior, o nervo isquiático foi dissecado e seccionado na altura do terço médio da coxa. Um segmento de aproximadamente 10 mm de comprimento foi excisado. O coto proximal do nervo isquiático foi ligado, curvado para trás e suturado no interior de músculos adjacentes para prevenir possíveis reinervações (Figura 6).

Todos os animais que foram utilizados, ou seja, sacrificados para coletas depois de 4 meses de cirurgia, foram re-operados pelo menos a cada 3 meses sendo o coto proximal novamente dissecado seccionado e suturado na musculatura adjacente, conforme anteriormente descrito sempre objetivando com isso prevenir a reinervação dos músculos a serem analisados.

Após todas as cirurgias os animais foram colocados em ambiente aquecido para evitar a hipotermia decorrente da anestesia geral. Sendo posteriormente mantidos em caixas plásticas, com no máximo 5 animais por caixa, com água e comida “*ad libitum*”, com ciclos claro/escuro de 12 horas, com temperatura e umidade controlada.

Figura 6 - Técnica Cirúrgica. A: animas em caixa plásticas, B e D: Tricotomia, C: Microscópio Cirúrgico, E: Nervo Isquiático dissecado, F e G: Secção de 10 mm do nervo.

Os 72 animais foram divididos em 12 grupos, 6 grupos desnervados e 6 grupos controle (Tabela 1).

TABELA 1. Divisão dos grupos.

GRUPO DESNERVADO						
GRUPOS	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
TEMPOS EXPERIMENTAIS	0 SEMANAS	12 SEMANAS	16 SEMANAS	19 SEMANAS	30 SEMANAS	38 SEMANAS
Nº de ANIMAIS	07 RATOS	07 RATOS	07 RATOS	07 RATOS	07 RATOS	07 RATOS
GRUPO CONTROLE NORMAL						
GRUPOS	GRUPO 7	GRUPO 8	GRUPO 9	GRUPO 10	GRUPO 11	GRUPO 12
TEMPOS EXPERIMENTAIS	0 SEMANAS	12 SEMANAS	16 SEMANAS	19 SEMANAS	30 SEMANAS	38 SEMANAS
Nº de ANIMAIS	05 RATOS	05 RATOS	05 RATOS	05 RATOS	05 RATOS	05 RATOS

4.2.COLETA DAS AMOSTRAS

Decorridos os períodos experimentais (0, 12, 16, 19, 30 e 38 semanas) os animais novamente foram anestesiados e eutanasiados conforme descrito anteriormente e os membros posteriores foram perfundidos via aorta abdominal com solução de Ringer contendo 1% de procaína hidrocloreica e 5.000 unidades/litro de heparina seguida por glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M.

Os músculos Sóleo e EDL foram dissecados e removidos (Figura 7), em seguida foram pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1% e embebidos em araldite.

Figura 7 - Dissecção e coleta dos músculos estudados

4.3.PREPARO HISTOLÓGICO e COLETA DE DADOS

Para a inclusão das amostras em historesina, as mesmas foram imersas em álcool a 95% por 2 horas. Depois, as amostras passaram 4 horas em uma mistura de álcool a 95% e historesina por 4 horas. Após este período o material ficou 24 horas em historesina líquida. Na sequência, as amostras foram colocadas em fôrmas com a historesina catalisada, para permitir o seu endurecimento e confecção dos blocos. Para o corte da historesina foram produzidas navalhas de vidro a partir de um “knife-maker” (Leica - EMKMR2, Áustria).

Células Satélite: Secções para observação em Microscópio Eletrônico foram obtidas dos mesmos blocos, coletados em grades próprias para análise no

microscópio eletrônico e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Cada grade apresenta cerca de 300 orifícios de forma quadrangular. Foram utilizadas secções que cobriam de 30 a 50 orifícios da grade e feito um esquema em papel de tal secção em baixa magnificação. Os orifícios cobertos pela secção foram numerados. Feito isto, em alta magnificação os mionúcleos e os núcleos das células satélites foram contados. Foram considerado mionúcleos todos os núcleos no interior de fibras que apresentavam miofilamentos enquanto que núcleos de células satélites foram considerados todos os núcleos no interior de células localizadas abaixo da lâmina basal da fibra muscular, ou mais precisamente entre a membrana basal e o sarcolema das fibras musculares estriadas esqueléticas. Secções seriadas foram obtidas a pelo menos 20 µm de distância para se evitar a possibilidade de contagem do mesmo mionúcleo por duas vezes. Uma área contendo pelo menos 400 mionúcleo foi investigada para cada músculo. Em todos os animais, as secções foram aferidas por dois observadores sendo que a porcentagem de células satélites não deferiu mais que 0,66%.

Fibras Intrafusais: Para análise dos fusos neuromusculares, os cortes histológicos transversais semi-finos foram feitos com a espessura 1,3 µm, passando pelo terço médio de cada músculo e posteriormente corados com parafenildiamine (ppd). Com a utilização de um microcomputador com um software de captura e análise de imagens, Image Pro-Plus 6.0, acoplado a um microscópio Olympus BX-50 e acoplado a este uma câmera fotográfica (Olympus DP-71) com resolução de 12 mega pixels, pôde ser contado os números de fibras intrafusais de cada grupo experimental. Para cada animal foram contadas as fibras intrafusais de todos os fusos localizados no corte histológico e feito uma média (Figura 8). A contagem foi realizada por 2 observadores, sendo a diferença entre os observadores menor que 0,5%.

Todos os músculos com sinais de reinervação tais como presença de axônios mielínicos ou grupos de miofibras com dimensões incompatíveis, foram descartados.

Figura 8 - Software Image Pro-Plus 6.0 (contagem de FIF).

4.4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A partir da contagem de células satélites e fibras intrafusais em ambos os músculos Sóleo e EDL, foi feita uma análise comparativa entre os grupos (Controle e Experimental) e os períodos de desnervação utilizando Análise de Variância a dois critérios e Test de Tukey.

Para correlação entre número de células satélites, fibras intrafusais e os períodos de desnervação utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson.

Para todas as análises, valores de $p < 0,001$ foram considerados significantes.

Os testes estatísticos foram aplicados através do programa Statistica v. 5.1 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

5 Resultados

5 RESULTADOS

Para melhor entendimento de nossos resultados decidimos dividi-los em itens como se segue:

5.1. Análise Quantitativa:

CÉLULAS SATÉLITES:

A porcentagem de células satélites em relação aos mionúcleos decresce com o tempo em músculos normais, sendo que em média existe uma maior incidência de células satélites no músculo Sóleo (músculo vermelho) se comparado ao músculo EDL (músculo branco) (Gráficos 1 e 2).

Observa-se também que a porcentagem de células satélites em músculos imediatamente após desnervação aumenta em relação ao músculo normal, principalmente no músculo EDL e depois decresce em ambos os músculos a partir da 12ª semana de desnervação (Gráficos 1 e 2).

Outra observação que merece ser destacada é que no período de 16 semanas de desnervação do grupo desnervado, a porcentagem de células satélites é semelhante à porcentagem de células satélites do grupo controle, em ambos os músculos estudados. Já nos outros períodos isto não ocorre (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1 - Porcentagem de células satélites (CS) no músculo Sóleo.

Gráfico 2 - Porcentagem de células satélites (CS) no músculo. EDL.

FUSOS NEUROMUSCULARES:

Os fusos neuromusculares que em músculos normais apresentam em média 4 fibras intrafusais, no músculo Sóleo já a partir da 16ª semanas pós-cirurgia apresentam este número aumentado. Já no músculo EDL tal alteração só foi possível ser observada após a 19ª semana pós-cirurgia (Gráficos 3 e 4).

Este aumento no número de fibras foi diretamente proporcional ao tempo de desnervação, ou seja, durante o progresso do tempo de desnervação dos músculos tanto do Sóleo quanto do EDL ocorreu um aumento no número de fibras intrafusais, se comparado com o grupo normal (Gráficos 3 e 4).

Gráfico 3 - Número de FIF no músculo Sóleo.

Gráfico 4 - Número de FIF no músculo EDL.

5.2. Análise Estatística

COMPARATIVA (Teste de Tukey):

- CÉLULAS SATÉLITES:

A análise estatística, comparando o número de células satélites entre os períodos de desnervações, tanto do grupo controle como do desnervado no músculo Sóleo, mostra diferença significativa entre a maioria dos períodos. Somente não houve diferença significativa entre os períodos: Controle 0 X Desnervado 12,

Controle 16 X Controle 19, Desnervado 16 X Controle 30 e Desnervado 19 X Controle 38. (Tabela 2 e Gráfico 1).

Em relação ao Músculo EDL, a análise estatística mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa apenas entre: Desnervado 16 X Controle 19 X Controle 30, onde se observa a porcentagem de células satélites muito próximas de um período para o outro. Sendo que no restante das comparações houve diferença estatisticamente significativa. (Tabela 2 e Gráfico 2).

Gráfico 5 - Correlação da % de células satélites (CS) e nº de FIF dos grupos controles no músculo Sóleo.

Gráfico 6 - Correlação da % de células satélites (CS) e nº de FIF dos grupos desnervados no músculo Sóleo.

- *FUSOS NEUROMUSCULARES:*

Através da análise estatística, pode-se observar em relação ao músculo Sóleo, que no grupo controle o número de Fibras Intrafusais entre os períodos experimentais, não teve diferença estatisticamente significativa (Tabela 2 e Gráfico 3).

Já no Grupo desnervado não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre: Desnervado 0 X Desnervado 12, Desnervado 16 X Desnervado 19 e Desnervado 30 X Desnervado 38 (Tabela 2 e Gráfico 3).

Porém, comparando grupo controle com experimental, ocorreu diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos, somente entre Controle 0 e Desnervado 0 não houve (Tabela 2 e Gráfico 3).

No músculo EDL, a análise estatística mostra uma similaridade com o músculo Sóleo, ou seja, no grupo controle o número de Fibras Intrafusais entre os períodos experimentais, não teve diferença estatisticamente significativa (Tabela 2 e Gráfico 4).

Em relação ao grupo desnervado só não houve diferença estatisticamente significativa entre o Desnervado 16 e 19 (Tabela 2 e Gráfico 4).

Comparando grupo controle com experimental não houve diferença estatisticamente significativa entre: Controle 0 X Desnervado 0 e Controle 12 X Desnervado 12 (Tabela 2 e Gráfico 4).

TABELA 2. Comparação entre grupos e tempos (Análise de variância a 2 critérios e Teste de Tukey)

	Grupo Controle Normal						Grupo Desnervado					
	0 Semanas	12 Semanas	16 Semanas	19 Semanas	30 Semanas	38 Semanas	0 Semanas	12 Semanas	16 Semanas	19 Semanas	30 Semanas	12 Semanas
CS (Sóleo) %	12,06 h	9,00 f	7,09 e	6,98 e	6,01 d	4,02 c	11,04 g	12,01 h	6,03 d	4,00 c	2,03 b	1,00 a
CS (EDL) %	8,89 i	7,04 g	6,01 f	5,00 e	5,05 e	3,02 c	8,09 h	11,05 j	4,96 e	3,94 d	2,05 b	1,04 a
FIF (Sóleo) nº	4,32 a	4,00 a	4,24 a	4,34 a	4,62 ab	4,64 ab	4,69 ab	5,34 b	6,70 c	6,71 c	7,69 d	8,07 d
FIF (EDL) nº	4,64 ab	4,68 b	4,34 ab	4,00 ab	4,60 ab	4,66 b	3,87 a	4,64 b	5,73 c	6,09 c	7,01 d	7,97 e

Grupos com letras iguais não possuem diferença estatisticamente significativa entre si linearmente.

CS (células satélites)

FIF (fibras intrafusais)

Gráfico 7 - Correlação da % de células satélites (CS) e nº de FIF dos grupos controles no músculo EDL.

Gráfico 8 - Correlação da % de células satélites (CS) e nº de FIF dos grupos desnervados no músculo EDL.

CORRELAÇÃO (Teste de Pearson)

Correlacionando o número de células satélites com o número de fibras intrafusais, observa-se uma correlação negativa estatisticamente significativa para ambos os músculos estudados (Sóleo e EDL), somente no grupo desnervado, ou seja, quanto mais se diminui o número de células satélites maior é o número de FIF (Tabela 3).

Já, correlacionando os tempos de desnervação com o número de células satélites e o número de fibras intrafusais, para ambos os músculos estudados (Sóleo e EDL), no grupo controle, houve uma correlação negativa estatisticamente significativa entre os tempos e o número de CS, isto é quando se aumenta o tempo de experimento, diminui o número de CS. Em relação às FIF, isto não ocorre, ou seja se aumenta o tempo e o número de fibras não se altera (Tabela 4).

Entretanto, para o grupo experimental, demonstra correlação negativa estatisticamente significativa para as CS e correlação positiva estatisticamente significativa como para FIF, ou seja, com o aumento do tempo de desnervação, diminui o número de CS e aumenta o número de FIF (Tabela 5).

TABELA 3. Coeficiente de correlação de Pearson com as respectivas significâncias para o número de células satélites (CS) relacionados números de Fibras intrafusais (FIF) dos músculos Sóleo e EDL no Grupo Controle.

	CONTROLE	DESNERVADO
CS x FIF (Sóleo)	r= -0,30 p=,107	r= -0,93 p=,000*
CS x FIF (EDL)	r= 0,06 p=,744	r= -0,87 p=,000*

*significante $p < 0,005$

r= - (coeficiente de correlação negativo)

TABELA 4. Coeficiente de correlação de Pearson com as respectivas significâncias para os diferentes TEMPOS de experimentais relacionados aos números de células satélites (CS) e número de Fibras intrafusais (FIF) dos músculos Sóleo e EDL no Grupo Controle.

	CS Sóleo (nº)	CS EDL (nº)	FIF Sóleo (nº)	FIF EDL (nº)
TEMPO EXPERIMENTAL	r = -0,97 p=,000*	r= -0,96 p=,000*	r= 0,35 p=,056	r= 0,02 p=,914

*significante $p < 0,005$

r= - (coeficiente de correlação negativo)

r= +(coeficiente de correlação positivo)

TABELA 5. Coeficiente de correlação de Pearson com as respectivas significâncias para os diferentes TEMPOS de experimentais relacionados aos números de células satélites (CS) e número de Fibras intrafusais (FIF) dos músculos Sóleo e EDL no Grupo desnervado.

	CS Sóleo (nº)	CS EDL (nº)	FIF Sóleo (nº)	FIF EDL (nº)
TEMPO EXPERIMENTAL	r = -0,89	r = -0,82	r = 0,94	r = 0,96
	p = ,000*	p = ,000*	p = ,000*	p = ,000*

*significante $p < 0,005$

r = - (coeficiente de correlação negativo)

r = + (coeficiente de correlação positivo)

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Quando se discute o melhor momento para se tentar a recuperação de um nervo e o músculo por ele innervado, deve-se levar em consideração evidentemente, as alterações que ocorrem em ambos para se tentar estabelecer em que momento o nervo e o músculo estão mais susceptíveis a um melhor padrão de regeneração. Assim, relacionados aos nervos, é sabido que nas fibras que sofreram axotomia, a produção de NGF (neuro growth factor) atinge nível máximo 24 horas após e mantém níveis elevados de NGF pelo menos até duas semanas após a lesão dos músculos, ou melhor, as fibras musculares desnervadas sofrem uma atrofia perdendo progressivamente massa tecidual (RODRIGUES & SCHMALBRUCH, 1995).

Em relação ao músculo desnervado por longo tempo, acima de 25 semanas, apresenta redução significativa no número de células satélites (RODRIGUES e SCHMALBRUCH, 1995), fato este importante para a recuperação do músculo como um todo. Portanto músculos com tempos longos de desnervação podem estar fadados a não apresentarem condições para uma possível reinervação.

A favor dessa ideia podemos encontrar um trabalho realizado por ANZIL & WERNIG (1989) que procedeu a desnervação do músculo peitoral de rã e observou, após quase 4 anos, a completa ausência de fibras musculares. No local foi observada apenas e tão somente uma lâmina conjuntiva.

Há tempos vários pesquisadores discutem o melhor momento para se tentar a reinervação em músculos que tiveram seus nervos motores seccionados. Para alguns os músculos estariam mais aptos a receber novo contato do nervo motor entre 12 e 16 semanas pós-lesão (DOLFINI, 2002) enquanto que para outros, quando não há perda tecidual, quanto mais rápida for a tentativa de reparo nervoso, melhor será o resultado de sua regeneração (RODRIGUES, 1998).

Classicamente, a tentativa de reinervação de músculo, deve ser realizada o mais rápido possível. No entanto, ao se analisar músculos desnervados, pode-se perceber que morfológicamente tais músculos apresentam fibras musculares com características de fibras jovens após 12 semanas de desnervação. É sabido que os músculos estriados esqueléticos existem como estruturas anatômicas antes de sua innervação. Os nervos desempenham papel importante na modulação de tais fibras, alterando sua constituição, ou melhor, modulando os diferentes tipos de fibras para

melhor atender à demanda funcional do músculo. Se o raciocínio for feito levando-se em conta o desenvolvimento natural dos músculos estriados esqueléticos, um pequeno retardo de algumas semanas parece-nos mais acertado do que a tentativa imediata de reinervação, especialmente quando ocorre perda tecidual.

Em nossa pesquisa realizamos experimentalmente lesão no nervo isquiático do rato (com perda tecidual) sem recuperação, ou seja, seccionamos o nervo isquiático, impedindo sua reinervação.

Os músculos escolhidos para análise morfológica de sua recuperação foram o músculo Sóleo e o EDL. A justificativa para tal escolha foi o fato do músculo Sóleo ser considerado um músculo postural, rico em fibras tipo SO (slow oxidative) e FOG (fast oxidative glycolytic), portanto mais homogêneo, diferentemente do EDL, que é um músculo rico em fibras tipo FG (fast glycolytic).

O presente estudo demonstrou que a incidência de células satélites diminui nos músculos Sóleo e EDL após desnervação. Esta diminuição na frequência de células satélites foi mais pronunciada do que a relacionada à idade em músculos normais. A reação inicial no músculo EDL após desnervação é um aumento da porcentagem das células satélites por um curto período e em seguida uma diminuição continua até próximo à zero após 30 semanas. O aumento na frequência de células satélites no músculo Sóleo também ocorreu em um breve período de tempo pós-cirurgia.

A proliferação das células satélites é nervo dependente ou pela atividade muscular mediada pela inervação. Suas percentagens são normais em músculos reinervados e regenerados (SCHULTZ, 1984), porém rapidamente declinam durante a regeneração desprovida de inervação (SCHMALBRUCH e LEWIS, 1994). Os eventos que ocorrem em um músculo desnervado podem ser descritos como lentos e não sincrônicos (ANZIL e WERNING, 1989; SCHMALBRUCH et al., 1991a; SCHMALBRUCH e LEWIS, 1994). Tais eventos afetam também as fibras intrafusais as quais têm seu número aumentado (SCHRODER, 1974), onde discutiremos posteriormente.

Acreditamos que a pobre recuperação da força muscular quando o reparo cirúrgico de um nervo motor tiver sido feito com muita demora, é devido não somente pelo impedimento da regeneração axonal através de um endoneuro fibrótico, mas também pela diminuição de células satélites enquanto o músculo permaneceu desnervado por um longo período.

Por outro lado, os nossos resultados demonstram que a frequência de células satélites em músculo desnervado se encontra muito próximo da frequência de células satélites em músculo normal, entre a 16ª e 19ª semana.

Em face dos resultados obtidos nesta pesquisa, e as informações referentes à literatura, parece-nos pertinente inferir que a melhor época para a reinervação de um músculo desnervado também seja, dentre outros fatores, o período entre a 16ª e 19ª semana, onde neste período o músculo desprovido de inervação se comporta como um músculo normal, innervado, se encontrando com quase a mesma frequência de células satélites, favorecendo a recuperação muscular.

Os fusos neuromusculares são mecanorreceptores, de localização intramuscular, sensíveis ao estiramento que geram ao SNC informações sobre o tamanho do músculo, a velocidade da contração, dessa forma contribuindo para a habilidade de um indivíduo em discernir o movimento articular (cinestesia) e o posicionamento articular (SHAFFER e HARRISON, 2007).

São estruturas complexas descritas por KÜHNE em 1887, órgãos receptores, cuja função é detectar as variações do comprimento do músculo, quando aumentado ou diminuído. Um fuso neuromuscular mede entre 4 a 7 mm de comprimento e 80 a 200 milimicra de diâmetro. O fuso neuromuscular é composto de 4 a 10 fibras musculares ou células musculares estriadas envoltas, na sua parte mediana, por uma cápsula de tecido conectivo contendo líquido no interior.

Em nosso estudo a média nos fusos em músculo normal não desnervado, apresentou de 4 a 5 FIF permanecendo com essa média até o final dos tempos experimentais, ou seja, até a 38ª semana.

Entretanto, nos grupos desnervado isso não ocorreu. Neste grupo, onde foram desnervados os músculos, ocorreu tanto no Sóleo como no EDL um aumento estatisticamente significativo no número de FIF diretamente proporcional ao aumento do tempo experimental.

Porém em estudos com humano, as alterações relacionadas ao envelhecimento do sistema proprioceptivo que estão concentradas principalmente no fuso neuromuscular demonstram uma perda de fibras intrafusais por fuso neuromuscular que teoricamente podem estar relacionados a uma degeneração própria do processo (PATTEN E CRAIK, 2002; SHAFFER E HARRISON, 2007).

Além disto, os mesmos autores supracitados sugerem que também estas alterações relacionadas ao envelhecimento estão ligadas a um aumento da

espessura da cápsula conjuntiva do fuso neuromuscular. Ao contrário do que observamos em nosso trabalho, onde somente nos grupos desnervados, a cápsula conjuntiva dos fusos neuromusculares sofreu alterações, ocorrendo um espessamento do tecido conjuntivo ao redor das fibras intrafusais.

Investigações na ultraestrutura do fuso neuromuscular em rato revelaram que as variações ultraestruturais de fibras intrafusais de ratos podem ser uma expressão de sua inervação motora variável (MILBURN, 1973).

Os fusos neuromusculares sofrem alterações com estrutura atípica em músculo esquelético de ratos recém-nascidos, porém, analisado em um curto período de tempo (ZELENÁ, 1957).

Em nossos resultados observamos que com o passar dos tempos experimentais, houve um aumento de fibras intrafusais no grupo desnervado em um longo período de tempos (38 semanas), onde este aumento é inversamente proporcional à porcentagem de células satélites, considerado estatisticamente significativa esta correlação. Sugerindo que o aumento de fibras intrafusais talvez seja uma tentativa do músculo de manter suas funções proprioceptivas, pela perda da função muscular em decorrência da desnervação.

As lesões nervosas periféricas que causam alterações morfofuncionais são de grande importância clínica, porque prejudicam 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 sequelas 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).

Sabe-se que as células satélites musculares contribuem no reparo de fibras musculares danificadas e na manutenção do músculo esquelético adulto, sendo expressamente importante na recuperação de uma lesão muscular.

Assim como, os receptores da sensação posicional como os fusos neuromusculares são imprescindíveis para percepção da posição (propriocepção), tanto estática quanto dinâmica, além de também serem extremamente importantes na manutenção do tônus muscular e em auxiliar o controle do movimento muscular.

Em vista do exposto, podemos salientar que esta pesquisa pode contribuir para outros estudos sobre recuperação de um músculo lesado, uma vez que observamos em nossos resultados um período sugestivo para reinervação de um músculo desnervados, sendo este entre 16^a e 19^a semana pós-desnervação, onde a proliferação de células satélites se comporta como em um músculo normal. Nossos resultados demonstram também que com o passar do tempo de desnervação o número de fibras intrafusais aumenta, sugerindo que mesmo o músculo em degeneração as fibras intrafusais aumentam em número na tentativa de manter as funções sensoriais e proprioceptivas.

Em resumo, outras pesquisas se fazem necessária para poder acrescentar os nossos achados, como por exemplo, qual seria o momento para o estímulo de regeneração nervosa para que coincida com o período sugerido para reinervação e assim podermos ter um protocolo ideal para tentar recuperar um músculo lesionado.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Diante dos nossos objetivos concluímos que:

1. Proliferação de células satélites:

- A porcentagem de células satélites em ambos os músculos Sóleo e EDL aumenta após a desnervação e a partir da 12ª semana diminui.
- Entretanto, a porcentagem de células satélites em ambos os músculos diminui nos músculos não desnervados (normais) com o envelhecimento.

2. Número de fibras intrafusais dos fusos neuromusculares:

- O número de FIF em ambos os músculos Sóleo e EDL aumenta após a desnervação.
- No grupo controle o número de FIF mantém a mesma média com o passar dos tempos experimentais.

3. A correlação entre a porcentagem de células satélites e o número de fibras intrafusais:

- A diminuição na porcentagem de células satélites é inversamente proporcional ao número de FIF, com o tempo de desnervação.

Referências

REFERÊNCIAS

ALTER, M. J. **Ciência da flexibilidade**. 2. ed. Porto Alegre: ARTMED, 1999.

ANDERSON, J. E. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. Pt 12, p. 2276-2292, jun 2006.

ANZIL, A. P.; WERNIG, A. Muscle fibre loss and reinnervation after long-term denervation. **Journal of Neurocytology**, v. 18, n. 6, p. 833-845, dez 1989.

BAGRICHEVSKY, M. Os efeitos dos exercícios de alongamento mediados pela propriocepção: discussão conceitual sobre processos adaptativos. **Revista Unicastelo**, v. 4, n.6, p. 54-61, 2001.

BAKER, B. A. et al. Impact of repetition number on muscle performance and histological response. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1275-1281, ago 2007.

BANI, D.; BERGAMINI, M. Ultrastructural abnormalities of muscle spindles in the rat masseter muscle with malocclusion-induced damage. **Histology and Histopathology**, v. 17, n. 1, p. 45-54, jan 2002.

BAZIN, S.; DELAUNAY, A. Biochemistry of inflammation. Vi. Fluctuations in the levels of collagen and nonfibrillar proteins in different types of inflammatory foci. Comparative studies. **Annales De l'Institut Pasteur**, v. 107, p. 163-172, ago 1964.

BECCAFICO, S. et al. Age-dependent effects on functional aspects in human satellite cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, p. 345-352, abr 2007.

BENDALL, E. R. Calculating wastage rates. **Nursing Times**, v. 63, n. 39, p. 1300-1301, 29 set 1967.

BERNE, R. M. et al. **Fisiologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2004.

BROOKS, S. V. Current Topics for Teaching Skeletal Muscle Physiology. **Adv Physiol Educ**, v. 27, n.1-4, p. 171-172, 2003.

CAMPOS, M. A.; NETO, B. C. **Treinamento funcional resistido: para melhoria da capacidade funcional e reabilitação de lesões musculoesqueléticas**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.

CHAZAUD, B. et al. In vitro evaluation of human muscle satellite cell migration prior to fusion into myotubes. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 19, n. 8, p. 931-936, nov 1998.

-
- CLARK, K. A. et al. Striated Muscle Cytoarchitecture: an Intricate Web of Form and Function. **Ann Rev Cell Dev Biol**, v.18, p.637-706, 2002.
- DANTAS, E.H.M. **Flexibilidade: alongamento e flexionamento**. 4 ed. Rio de Janeiro: Shape, 1999.
- DAVATZ, G. C. et al. Apoptosis in denervated skeletal muscle. **International Journal of Morphology**, v. 25, p. 529-536, 2007.
- DE ANGELIS, L. et al. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. **The Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 4, p. 869-878, 15 nov 1999.
- DESAKI, J. Scanning electron microscopic study of muscle spindles in the tenuissimus muscle of the Chinese hamster: with reference to the outer capsule, inner capsule and fusimotor endings. **Journal of Electron Microscopy**, v. 50, n. 1, p. 65-72, 2001.
- DESAKI, JUNZO; NISHIDA, N. The sensory region of muscle spindles in the posterior cricoarytenoid muscle of the marmoset. **Journal of Electron Microscopy**, v. 55, n. 6, p. 301-304, dez 2006.
- DOLFINI, M.I. **Apoptose e células satélites em músculo desnervado por longo período**. 2002. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 2001.
- DREYER, H. C. et al. Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. **Muscle & Nerve**, v. 33, n. 2, p. 242-253, fev 2006.
- FERNANDES, K.C. et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 9, n. 2, p. 235-241, 2005.
- FERREIRA, A. T. Fisiologia da Contração Muscular. **Revista Neurociências**, v.13, n.3, p.60-62, 2005.
- GEEVES, M. A.; HOLMES, K. C. Structural Mechanism of Muscle Contraction. **Ann Rev Biochem**, v.68, p.687-728, 1999.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- HAMILL, J.; KNUTZEN, K. M. **Bases biomecânicas do movimento humano**. São Paulo: Manole, 1999.
- HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 91, n. 2, p. 534-551, ago 2001.

HILL, M.; GOLDSPINK, G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. **The Journal of Physiology**, v. 549, n. Pt 2, p. 409-418, 1 jun 2003.

HOSPOD, V. et al. Changes in human muscle spindle sensitivity during a proprioceptive attention task. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 19, p. 5172-5178, 9 maio 2007.

IJKEMA-PAASSEN, J. et al. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1583-1592, abr 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KATZ B. The terminations of the afferent nerve fibre in the muscle spindle of the frog. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 243, p. 221-240, 1961

KERN, H. et al. Denervated muscles in humans: limitations and problems of currently used functional electrical stimulation training protocols. **Artificial Organs**, v. 26, n. 3, p. 216-218, mar 2002.

KUCERA, J. Intrafusal muscle fiber histochemistry following its motor reinnervation. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 25, n. 11, p. 1260-1263, nov 1977b.

KUCERA, J. Splitting of the nuclear bag fiber in the course of muscle spindle denervation and reinnervation. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 25, n. 9, p. 1102-1104, set 1977a.

KUJAWA, M.; BARAN, W.; JANKOWSKA-STEIFER, E. Quantitative ultrastructural changes in satellite cells of rats immobilized after soleus muscle denervation. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 78, n. 1, p. 78-85, fev 2005.

KÜHNE W. Neue Untersuchungen iiber motorische Nervenendigungen. **Zeitschrift fur Technische Biologie Neue Folge**, , v. 23, p. 1-148. 1887.

LIEBER RL. **Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation**, 2. ed. San Diego: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

LU, D. X.; HUANG, S. K.; CARLSON, B. M. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. **The Anatomical Record**, v. 248, n. 3, p. 355-365, jul 1997.

- MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, p. 493-495, fev 1961.
- MAZANET, R.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **The satellite cell**. In ENGEL, A. G. and BANKER, B. Q. (Eds). *Myology: Basic and Clinical*. New York: McGraw-Hill, 1986, p. 285-307.
- MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do Exercício**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- MCFARLAND, D. C. et al. The role of myostatin in chicken (*Gallus domesticus*) myogenic satellite cell proliferation and differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 151, n. 3, p. 351-357, 1 maio 2007.
- MCGEACHIE, J.; ALLBROOK, D. Cell proliferation in skeletal muscle following denervation or tenotomy. A series of autoradiographic studies. **Cell and Tissue Research**, v. 193, n. 2, p. 259-267, out 1978.
- MCGEACHIE, J. K.; GROUNDS, M. D. Cell proliferation in denervated skeletal muscle: does it provide a pool of potential circulating myoblasts? **Bibliotheca Anatomica**, v. 29, p. 173-193, 1986.
- MCGEACHIE, J. K. Sustained cell proliferation in denervated skeletal muscle of mice. **Cell and Tissue Research**, v. 257, n. 2, p. 455-457, ago 1989.
- MILBURN, A. The early development of muscle spindles in the rat. **Journal of Cell Science**, v. 12, n. 1, p. 175-195, jan 1973.
- MINAMOTO, VB. Efeito da desnervação no músculo esquelético: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**, v. 20, p. 63-69, 2007.
- MOREIRA, C.; CARVALHO, M. A. **Noções práticas de reumatologia**. Belo Horizonte: Health, 1996.
- MORGUETI, M. et al. Alterações das fibras musculares esqueléticas desnervadas e reinervadas em diferentes períodos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. n. 2, p. 49-50, 2007.
- MURRAY, M. A.; ROBBINS, N. Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells. **Neuroscience**, v. 7, n. 7, p. 1823-1833, jul 1982.
- OVALLE, W. K.; DOW, P. R.; NAHIRNEY, P. C. Structure, distribution and innervation of muscle spindles in avian fast and slow skeletal muscle. **Journal of Anatomy**, v. 194, n. 3, p. 381-394, abr 1999.

PARTRIDGE, T. The Role of Satellite Cells and Circulating Stem Cells in Regeneration of Skeletal Muscle. **Basic and Applied Myology**, v. 13, n. 6, p. 277-280, 2003.

PATTEN, C.; CRAIK, R.L. **Alterações Sensoriomotoras e Adaptação no Idoso**. In: GUCCIONE, A. A (Org.). **Fisioterapia Geriátrica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 73-102,

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia de exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2000.

RANTANEN, J. et al. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 72, n. 3, p. 341-347, mar 1995.

RODRIGUES, A. C.; ANDREO, J. C.; RODRIGUES, S.P.M. Myonuclei and satellite cells in denervated rat muscles: an electron microscopy study. **Microsurgery**, v. 26, n. 5, p. 396-398, 2006.

RODRIGUES, A.C. **Estudo das alterações das fibras musculares estriadas esqueléticas desnervadas por longo período**. 1998. 54 f. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 1998.

RODRIGUES, A. C. et al. Apoptosis in long-term denervated rat skeletal muscle. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 151-156, 2006.

RODRIGUES, A. C. et al. Fat cell invasion in long-term denervated skeletal muscle. **Microsurgery**, v. 27, n. 8, p. 664-667, 2007.

RODRIGUES, A. C. et al. Satellite cells and myonuclei in neonatally denervated rat muscle. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 107, n. 1, p. 51-56, mar 2002.

RODRIGUES, A.C.; SCHMALBRUCH, H. Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. **The Anatomical Record**, v. 243, n. 4, p. 430-437, dez 1995.

ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1985.

SCHIAFFINO, S. et al. How is muscle phenotype controlled by nerve activity? **Italian Journal of Neurological Sciences**, v. 20, n. 6, p. 409-412, dez 1999.

SCHMALBRUCH, H.; AL-AMOOD, W. S.; LEWIS, D. M. Morphology of long-term denervated rat soleus muscle and the effect of chronic electrical stimulation. **The Journal of Physiology**, v. 441, p. 233-241, set 1991.

SCHMALBRUCH, H. et al. A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 50, n. 3, p. 192-204, 1991.

SCHMALBRUCH, H.; LEWIS, D. M. A comparison of the morphology of denervated with aneurally regenerated soleus muscle of rat. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 15, n. 3, p. 256-266, jun 1994.

SCHMALBRUCH, H. Satellite cells of rat muscles as studied by freeze-fracturing. **The Anatomical Record**, v. 191, n. 3, p. 371-376, jul 1978.

SCHRÖDER, J. M. The fine structure of de- and reinnervated muscle spindles. II. Regenerated sensory and motor nerve terminals. **Acta Neuropathologica**, v. 30, n. 2, p. 129-144, 1974.

SCHULTZ, E. A quantitative study of satellite cells in regenerated soleus and extensor digitorum longus muscles. **The Anatomical Record**, v. 208, n. 4, p. 501-506, abr 1984.

SCHULTZ, E.; MCCORMICK, K. M. Skeletal muscle satellite cells. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 123, p. 213-257, 1994.

SEKIYA, S. et al. Effects of nerve growth factor on differentiation of muscle spindles following nerve lesion in neonatal rats. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 2019-2025, jul 1986.

SHAFFER, S.W.; HARRISON, A.L. Aging of the Somatosensory System: A Translational Perspective. **Physical Therapy**, v. 87, n. 2, p. 193-207, 2007.

SNOW, M. H. A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. **The Anatomical Record**, v. 207, n. 4, p. 593-604, dez 1983.

TAJIKA, Y. et al. VAMP2 is expressed in muscle satellite cells and up-regulated during muscle regeneration. **Cell and Tissue Research**, v. 328, n. 3, p. 573-581, jun 2007.

VIGUIE, C. A. et al. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. **The Anatomical Record**, v. 248, n. 3, p. 346-354, jul 1997.

VITELLO, L. et al. Enhancing Myoblast Proliferation by Using Myogenic Factors: A Promising Approach for Improving Fiber Regeneration in Sport Medicine and Skeletal Muscle Diseases. **Basic and Applied Myology**, v. 14, n. 1, p. 45-51, 2004.

YABLONKA-REUVENI, Z.; RIVERA, A. J. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. **Developmental Biology**, v. 164, n. 2, p. 588-603, ago 1994.

ZELENA, J. (1957). The morphogenetic influence of innervation on the ontogenetic development of muscle spindles. **Journal of Embryology Experimental. Morphology**, v. 5, p. 283-292, 1957.

Apêndices

APÊNDICE A - Tabela da Descrição dos grupos.

	CS_S N	CS_S N	CS_EDL N	CS_EDL N	CS_S %	CS_S %	CS_EDL %	CS_EDL %	FIF_S N	FIF_S N	FIF_EDL N	FIF_EDL N
	Means	Std.Dev	Means	Std.Dev	Means	Std.Dev	Means	Std.Dev	Means	Std.Dev	Means	Std.Dev
Controle 1 0	48,22	0,60	35,56	1,18	12,06	0,15	8,89	0,30	4,32	0,46	4,64	0,48
Controle 2 12	36,00	0,54	28,14	0,70	9,00	0,13	7,04	0,18	4,00	0,35	4,68	0,25
Controle 3 16	28,34	0,52	24,02	0,41	7,09	0,13	6,01	0,10	4,24	0,51	4,34	0,46
Controle 4 19	27,92	0,91	20,00	0,77	6,98	0,23	5,00	0,19	4,34	0,43	4,00	0,62
Controle 5 30	24,02	0,41	20,20	0,68	6,01	0,10	5,05	0,17	4,62	0,48	4,60	0,27
Controle 6 38	16,06	1,03	12,08	1,26	4,02	0,26	3,02	0,31	4,64	0,43	4,66	0,51
Desnervado 1 0	44,14	0,71	32,34	1,29	11,04	0,18	8,09	0,32	4,69	0,20	3,87	0,50
Desnervado 2 12	48,06	0,57	44,19	0,76	12,01	0,14	11,05	0,19	5,34	0,05	4,64	0,38
Desnervado 3 16	24,11	0,42	19,86	0,68	6,03	0,11	4,96	0,17	6,70	0,60	5,73	0,21
Desnervado 4 19	16,01	0,90	15,76	0,90	4,00	0,22	3,94	0,22	6,71	0,31	6,09	0,32
Desnervado 5 30	8,13	0,47	8,19	0,87	2,03	0,12	2,05	0,22	7,69	0,23	7,01	0,20
Desnervado 6 38	4,00	0,30	4,16	0,62	1,00	0,08	1,04	0,15	8,07	0,25	7,97	0,34

Anexos

ANEXO A – Carta do parecer da Comissão de Ética e Pesquisa em animais da FOB/USP.

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

CEEPA-Proc. Nº 022/2009

Bauru, 13 de agosto de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado ***“Caracterização dos fusos musculares estriados desnervados por longo período em ratos”***, de autoria de André Luis Shinohara foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito ***“ad referendum”*** desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

Docente do Departamento de Ciências Biológicas