UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DANIEL VENTURA DIAS

**Tecido adiposo e enxerto com tubo de polietileno poroso usados
na técnica de tubulização influenciaria na reinervação de músculos
de contração lenta e rápida de ratos?**

BAURU
2011

DANIEL VENTURA DIAS

Tecido adiposo e enxerto com tubo de polietileno poroso usados na técnica de tubulização influenciaria na reinervação de músculos de contração lenta e rápida de ratos?

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

BAURU
2011

D543t Dias, Daniel Ventura
Tecido adiposo e enxerto com tubo de polietileno poroso usados na técnica de tubulização influenciaria na reinervação de músculos de contração lenta e rápida de ratos?/ Daniel Ventura
Dias - Bauru, 2011
138 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (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 dissertação/tese, por processos fotocopadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 036/ 2011
Data: 10/ 11/ 2011

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a meus pais **Joaquim e Maria Helena**, a quem palavras me faltam para agradecer sua existência. Obrigado por me ensinar e conduzir através de atos e exemplos o verdadeiro significado do amor, honestidade, respeito, responsabilidade e o valor da família.

Ao meu irmão **Adriano Ventura Dias**, por sua alegria contagiante, amizade, companheirismo, cumplicidade, e por sempre me incentivar nesta caminhada. Obrigado pela pessoa maravilhosa que você é.

A minha namorada **Letícia Rossi Daré**, palavras me faltariam para te agradecer, mas obrigado pelo seu carinho, companheirismo, risadas, amizade, apoio, paciência e pela enorme colaboração nesta dissertação. Obrigado pelos melhores momentos ao teu lado. Te amo.

Aos meus avós **Joaquim Dias Filho** (*in memoriam*), **Iliduvina Terenciano Dias**, **Roque Harold Ventura**, **Aparecida Martins Ventura** e por toda a minha família na qual sempre acreditou em mim, pela preocupação, orações, carinho e motivações ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado na realização deste sonho e por ter me dado força em todos os momentos de minha vida.

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, primeiramente por confiar na minha capacidade, pelo seu profissionalismo e ética, pelas lições de anatomia, pelos ensinamentos de vida e pela inestimável amizade em todos estes anos de convivência.

Ao Prof. **Dr. Antonio de Castro Rodrigues**, por todos os seus ensinamentos, pelas conversas, amizade, conselhos e pelos estímulos durante esta caminhada.

Ao **Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim**, pelo apoio, conselhos, pela amizade e colaboração ao longo deste trabalho.

Agradeço ao **Prof. Dr. João Cleber Teodoro de Andrade**, por ajudar-me nos momentos mais decisivos de minha carreira e por sempre acreditar em meu potencial. Obrigado pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Heitor Marques Honório** pela colaboração e elaboração das análises estatísticas.

Ao amigo e doutorando **Geraldo Marco Rosa Junior**, pelo companherismo, apoio, e cumplicidade não só para a realização deste trabalho, mas também para minha vida. Não importa a quantidade de tempo que passamos com cada amigo, mas sim a qualidade do tempo que vivemos juntos. Obrigado irmão!

Ao amigo e doutorando **Luis Henrique Rapucci Moraes**, pela colaboração, auxílio e dedicação na realização desta dissertação.

Aos **Professores e funcionários da Faculdade Anhanguera de Bauru** pelo apoio e torcida durante este projeto.

Aos estagiários e amigos, **Marina Bichusky, Cleuber Rodrigo de Souza Bueno e Idvaldo Aparecido Favaretto Junior**, pela ajuda, amizade, brincadeiras e companheirismo durante a execução deste projeto.

Ao chefe do laboratório de Anatomia **Prof. Dr. João Lopes de Toledo Filho** e aos funcionários da anatomia, **Romário, Orivaldo, Cisira** (*in memorian*), **Lourisvalda, Daniela, e André**. Obrigado pelo apoio e pelas horas de conversa durante o café.

À **Márcia** do Centro Integrado em Pesquisa, pela colaboração, auxílio e paciência nas fotomicrografias do microscópio confocal.

À **Tânia, Patrícia e Daniella** do laboratório de Histologia, pelo colaboração e auxílio nas técnicas histológicas.

A Secretária da Pós-Graduação, **Vera Rufino**, pelo apoio e auxílio neste trabalho.

A **Mileni** e a **Aline** do laboratório de Bioquímica, pelo auxílio e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos colegas de pós-graduação de mestrado e doutorado **Gustavo Toledo, Bruno Viscelli, Ricardo Arantes, Valério Germino, Eduardo Belai, Lucas Bermejo, e Farooque Ahmed**.

Ao **Antônio José Minetto Daré, Maria José Rossi Daré, Danilo Rossi Daré, Fernanda Rossi Daré** e ao **Alessandro José Morelli**, por ter me aceitado como parte da família, e por suas belas palavras de apoio, estímulo e carinho nesta caminhada.

Aos meus familiares bauruenses **Geraldo Marco Rosa e Salete Bortolucci**, por estarem sempre preocupados comigo e pelo grande carinho.

Aos amigos, **Lilian Pisano e Rogério, Marcelo e Marianne Zanin, Paula Bartolo, Thiago Spagnuolo, Natália Orti, Gabriela Boarato, Matheus e Kali, Raquel,**

Paulo, Lucas e Leire, Vivian e Richard, Marcelo e Luciana pelo apoio, incentivo, risadas e pelos momentos de convivência.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta dissertação, o meu muito obrigado!

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar".

(Anatole France)

RESUMO

Problemas relacionados a lesões de nervos periféricos com consequentes perdas sensitivas e motoras tornaram-se frequentes no dia a dia da prática clínica e hospitalar, em consequência do aumento da violência urbana, dos acidentes de trânsito, acidentes profissionais e domésticos. Por esta razão, a busca por estratégias e técnicas que possam reparar a lesão nervosa e restabelecer a função do tecido lesado é importante e de grande valia no âmbito da saúde. Para reparar lesões nervosas com perda de tecido nervoso, várias técnicas cirúrgicas têm sido utilizadas, uma das técnicas mais comum é o uso do enxerto autógeno, mas técnicas alternativas têm sido propostas a fim de evitar as complicações ao local doador e acelerar o processo de regeneração nervosa como, por exemplo, a da tubulização. O uso desta técnica tem sido mais utilizado para o preenchimento dos tubos com substâncias que acelerem ou induzam o crescimento axonal. Baseado no exposto anteriormente pensou-se na realização desta pesquisa com o objetivo de verificar se uso de tubo de polietileno poroso preenchido ou não com tecido adiposo na técnica de tubulização alteraria a recuperação dos músculos sóleo (de contração lenta) e Extensor longo dos dedos (de contração rápida). Para isso foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*), Wistar, machos, que foram divididos em cinco grupos, sendo, três controles, e dois experimentais. Nos grupos experimentais foram realizados a tubulização de polietileno poroso preenchido ou não com tecido adiposo (GECp e GESp, respectivamente). Os tubos foram testados para avaliar a eficácia em reduzir a lacuna crítica de 10 mm do nervo isquiático. Os animais dos grupos experimentais foram sacrificados 150 dias após a cirurgia. Dos três grupos controles, dois não sofreram intervenção cirúrgica, e receberam o nome de inicial (GCI) e final (GCF) e foram sacrificados com 80 e 230 dias de vida respectivamente. E no outro grupo controle, denominado desnervado (GCD) os animais foram submetidos à secção do nervo isquiático. Antes do sacrifício os animais foram submetidos à análise funcional da marcha. Durante o sacrifício foram retiradas amostras dos músculos sóleo e Extensor longo dos dedos, que foram submetidas à coloração de Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Masson, e também a reações de m-ATPase e NADH-Tr. Imunomarcações foi utilizada para a expressão de Myod e miogenina. Os dados foram submetidos ao tratamento estatístico. Os resultados mostraram que nos animais dos grupos experimentais tiveram melhor recuperação

muscular do que os dos animais desnervados e foi inferior quando comparado com o grupo controle final (GCF). Baseado nestes dados pode-se concluir que o uso do tubo de polietileno poroso com preenchimento de tecido adiposo interferiu positivamente na recuperação tanto do músculo sóleo quanto o extensor longo dos dedos.

Palavras-chaves: Técnica de tubulização. Polietileno. Músculo sóleo. Músculo extensor longo dos dedos. Regeneração. Ratos.

ABSTRACT

Problems related to injuries of peripheral nerves with consequent sensory and motor losses are seen more frequently in daily clinical and hospital practice due to an increase in urban violence, traffic accidents, domestic and labour accidents. For this reason, the search for strategies and techniques that can repair nerve damage and restore function of damaged tissue is important and of great value in health care. To repair nerve damage with loss of nerve tissue, several surgical techniques have been used, one of the common techniques is the use of the autograft, but alternative techniques have been proposed to avoid complications to the donor site and accelerate the process of nerve regeneration, such as tubulization. The use of this technique has been further utilized by filling the tubes with substances that speed up or induce axonal growth. Based on the previous work, in this research we wanted to see whether tubulization with the help of porous polyethylene tube filled with and without adipose tissue alter the recovery of the soleus (slow twitch) and extensor digitorum longus (fast twitch) muscles. For this we used 45 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), who were divided into five groups, three control and two experimental. In the experimental groups, tubulization was performed using porous polyethylene filled with (GECP) and without adipose tissue (GESP). The conduits were tested for efficacy in bridging the critical gap length of 10 mm in sciatic nerves. The animals of experimental groups were sacrificed 150 days after surgery. Of the three control groups, two did not undergo surgery, and were named as (GCI) for Initial and (GCF) for final group in which the animals were sacrificed at 80 and 230 days old respectively. And another control group, called denervated (GCD), the animals were subjected to sciatic nerve section. Prior to sacrifice the animals were subjected to functional analysis of gait. During the sacrifice, samples were taken from soleus and extensor digitorum longus muscles, which were stained with Hematoxylin and Eosin, Masson's trichrome and were also subjected to reactions of m-ATPase and NADH –Tr. Immunostaining was also utilised for the expression of MyoD and myogenin. The data were analyzed statistically. The results showed that animals of experimental groups have better muscle recovery than those of denervated animals however the recovery was inferior when compared with the final control group (GCF). Based on these data we can conclude that the use of

porous polyethylene tube filled with adipose tissue had a positive influence on the recovery of both the soleus and extensor digitorum longus.

Keywords: Tubulization technique. Polyethylene. Soleus muscle. Extensor digitorum longus muscle. Regeneration. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática de um nervo e suas estruturas.....	30
Figura 2 -	Representação esquemática da classificação dos tipos de lesões nervosas periféricas.....	31
Figura 3 -	Representação esquemática da técnica de tubulização.....	33
Figura 4 -	Diagrama esquemático do tecido muscular e organização do tecido conjuntivo.....	36
Figura 5 -	Rede regulatória da diferenciação muscular.....	39
Figura 6 -	Representação esquemática para calcular a análise funcional da marcha.....	43
Figura 7 -	Demonstração esquemática das dimensões do tubo de Polietileno Poroso.....	51
Figura 8 -	Demonstração esquemática da disposição dos poros no tubo de Polietileno Poroso.....	52
Figura 9 -	Exemplar dos anestésicos utilizados nos procedimentos cirúrgicos.....	54
Figura 10 -	Realização da tricotomia na face dorsolateral do membro pélvico direito do rato; e animal com as patas fixadas em placa de cortiça.....	55
Figura 11 -	Incisão de 2 cm na face dorsolateral da coxa direita do animal; e divulsão dos tecidos subcutâneos e musculatura	

subjacente, e exposição do nervo isquiático.	56
Figura 12 - Aspecto do tubo de polietileno poroso em comparação a uma lâmina de bisturi número 11; e demonstração da remoção do tecido adiposo “in natura”.....	56
Figura 13 - Vista da secção transversal do tubo de polietileno poroso; e imagem revelando a inserção do tecido adiposo autógeno no interior do tubo	56
Figura 14 - Tecido adiposo exposto em recipiente com soro fisiológico 0,9%; e preenchimento com tecido adiposo, sem obliterar totalmente o lume do tubo de polietileno.....	57
Figura 15 - Nervo isquiático seccionado cirurgicamente.....	57
Figura 16 - Tubo do grupo GECP, fixado em suas extremidades com fio mononylon 10.0.....	58
Figura 17 - Amostras musculares envoltas por talco neutro; e amostras musculares em blister para congelamento em nitrogênio líquido.....	59
Figura 18 - Microscópio, micro computadores e monitores para análise de imagens e morfometria; e demonstração da análise morfométrica das fibras musculares.....	62
Figura 19 - Valores das medições e fatores para a análise funcional do nervo isquiático.....	64
Figura 20 - Canaleta de madeira utilizada para realização do teste de avaliação funcional do nervo isquiático; e Impressão da região plantar das patas posteriores em faixa de papel.....	65

Figura 21 - Fotomicrografia do músculo sóleo corados em HE.....	70
Figura 22 - Fotomicrografia do músculo EDL corado em HE.....	71
Figura 23 - Fotomicrografia das fibras musculares normais e reinervadas coradas em HE.....	72
Figura 24 - Representação gráfica da média das áreas das fibras musculares do sóleo e EDL.....	73
Figura 25 - Resultado das amostras do músculo Sóleo do GECP submetidas a reações histoenzimológicas, m-ATPse ácida, pH4.35 e pH 4.6; alcalina pH 10.4; reação NADH-Tr.....	74
Figura 26 - Resultado das reações histoenzimológicas das amostras do músculo EDL do GECP, reações m-ATPse ácida, pH4.35 e 4.6; alcalina pH 10.4; e reação NADH-Tr.....	75
Figura 27 - Fotomicrografia das fibras musculares de difícil caracterização do perfil fenotípico do grupo GCD.....	75
Figura 28 - Representação gráfica da média das áreas dos tipos de fibras do músculo sóleo.....	77
Figura 29 - Representação gráfica da percentagem dos tipos de fibras do músculo sóleo.....	78
Figura 30 - Representação gráfica da média das áreas dos tipos de fibras do músculo EDL.....	79
Figura 31 - Representação gráfica da percentagem dos tipos de fibras do músculo EDL.....	80

Figura 32 - Fotomicrografia da reação mATPase em pH 4,35 evidenciando grupos de fibras de mesmo perfil fenotípico.....	81
Figura 33 - Fotomicrografia da invasão de tecido conjuntivo no músculo sóleo.....	82
Figura 34 - Fotomicrografia da invasão de tecido conjuntivo do músculo EDL.....	83
Figura 35 - Representação gráfica da média da percentagem de tecido conjuntivo do músculo sóleo e EDL.....	85
Figura 36 - Fotomicrografia das reações de imunofluorescência, mostrando a localização de MyoD e núcleos.....	86
Figura 37 - Fotomicrografia das reações de imunofluorescência, mostrando a localização de Miogenina e núcleos.....	87
Figura 38 - Fotomicrografia das reações de imunohistoquímica, mostrando a localização de núcleos expressando MyoD	88
Figura 39 - Fotomicrografia das reações de imunohistoquímica, mostrando a localização de núcleos expressando Miogenina	89
Figura 40 - Representação gráfica da percentagem de tecido núcleos expressando myoD no músculo sóleo e EDL.....	90
Figura 41 - Representação gráfica da percentagem de tecido núcleos expressando miogenina no músculo sóleo e EDL.....	91
Figura 42 - Representação gráfica da análise funcional da marcha pelo índice funcional do isquiático.....	92

Figura 43 - Membro em que foi submetido à cirurgia, relatando
autofagia de seu membro pélvico direito e paralisia da pata
do animal do grupo GECP..... 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média da área (em μm^2) e desvio padrão (D.P) dos músculos sóleo e EDL.....	72
Tabela 2 - Resultados das reações de m-ATPase e NADH-Tr que foram submetidas às amostras dos músculos sóleo e EDL...	73
Tabela 3 - Área média (μm^2), desvio padrão (D.P) e percentagem (%) dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo sóleo dos grupos estudados.....	76
Tabela 4 - Área média (μm^2), desvio padrão (D.P) e percentagem (%) dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo EDL dos grupos estudados.....	78
Tabela 5 - Média da percentagem da área (μm^2) de tecido conjuntivo encontrada nos grupos do músculo sóleo e EDL.....	84
Tabela 6 - Percentagem de núcleos expressando MyoD nos músculos sóleo e EDL.....	89
Tabela 7 - Percentagem de núcleos expressando Miogenina nos músculos sóleo e EDL.....	90
Tabela 8 - Análise funcional da marcha, utilizando a equação de BAIN et al.,(1989), postas em ordem decrescente.....	91
Tabela 9 - Pesos médios, iniciais e finais, em gramas (g) e ganhos de peso em %, dos animais de todos os grupos.....	92

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	Lesões nervosas periféricas	29
2.1.1	Técnica de tubulização	32
2.2	Tecido adiposo	33
2.3	Músculo estriado esquelético	34
2.4	Músculo estriado esquelético desnervado e reinervado	36
2.5	O músculo esquelético e seus tipos de fibras	40
2.6	Análise funcional da marcha	42
3	OBJETIVOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	Características Morfológicas dos tubos de Polietileno Poroso	51
4.2	Animais utilizados	52
4.3	Anestesia dos animais	53
4.4	Procedimento Cirúrgico	54
4.5	Processamento para coleta de amostras e criopreservação	58
4.6	Colorações de HE e Tecido conjuntivo	59
4.7	Histoquímica para m-ATPase e NADH:	59
4.8	Processamento para análise morfométrica	60
4.9	Imunofluorescência	61
4.10	Imunohistoquímica	62
4.11	Análise Funcional da marcha	63
4.12	Tratamento Estatístico	65
5	RESULTADOS	69
5.1	Caracterização morfológica das fibras submetidas à coloração com HE, reações de mATPase e NADH	69
5.1.1	Coloração com HE	69
5.1.2	Coloração com m-ATPase.	73
5.2	Análise morfométrica do tecido conjuntivo	81
5.3	Localização dos fatores de regulação miogênica MyoD e Miogenina por imunofluorescência.	85

5.4	Localização dos fatores de regulação miogênica MyoD e Miogenina por imunohistoquímica.	87
5.5	Análise funcional da marcha.	91
5.6	Peso dos animais	92
5.7	Observações Macroscópicas	93
6	DISCUSSÃO	97
7	CONCLUSÕES	109
	REFERÊNCIAS	113
	ANEXOS	137

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Problemas relacionados a lesões de nervos periféricos com consequentes perdas funcionais e motoras tornam-se frequentes no dia a dia clínico e hospitalar, em consequência do aumento da violência urbana, dos acidentes de trânsito, acidentes profissionais e domésticos (DE SÁ et al., 2004; MAZZER et al., 2006). Essas lesões podem ser causadas por diversos fatores, como esmagamento, compressão, estiramento, avulsão e secção parcial ou total do nervo, que causam interrupção ou diminuição da transmissão de impulsos nervosos produzindo diminuição ou perda da sensibilidade e motricidade no território inervado por ele (MONTE-RASO et al., 2006).

Os problemas gerados pelas lesões nervosas levam a um aumento nas despesas em saúde pública e previdenciária, além do impacto negativo que estas lesões causam sobre o indivíduo, seus familiares e a sociedade (SEBBEN et al., 2011).

Pelos motivos expostos anteriormente, a busca por estratégias e técnicas que possam reparar a lesão nervosa e restabelecer a função motora e sensitiva é frequente e de grande valia no âmbito da saúde.

Nas lesões de nervos periféricos normalmente faz-se necessária a utilização de reparo cirúrgico, principalmente quando ocorre perda de tecido nervoso, já que os cotos nervosos precisam ser religados, e para isso, existe a necessidade de enxertos para ocupar a lacuna (“gap”) entre os cotos proximal e distal.

A utilização de enxerto autógeno é considerada o padrão-ouro para o reparo das lesões com perda de tecido nervoso, porém técnicas alternativas tem sido propostas a fim de evitar as complicações ao local doador e acelerar o processo de regeneração nervosa (MIDHA et al., 2003).

Uma das técnicas sugeridas para resolver o problema da perda da continuidade do tecido nervoso é a da tubulização, ou entobulização, onde os cotos nervosos seccionados são introduzidos e fixados em uma prótese tubular, deixando uma lacuna “gap” entre as terminações nervosas (OLIVEIRA; PIERUCCI; PEREIRA, 2004).

Diversos materiais são utilizados para a confecção da prótese, entre eles colágeno (AEBISCHER; SALESIOTIS; WINN, 1989), tecido autógeno, como veia (WALTON et al., 1989; KARAGOZ et al., 2009), artéria (BARCELOS et al., 2003), e materiais sintéticos como silicone (OLIVEIRA; PIERUCCI; PEREIRA, 2004; XU et al., 2009) e um dos mais utilizados é o polietileno (FIELDS et al., 1989; LANGONE; DA-SILVA, 1990; BRAYN; WANG; SUMMERHAYES, 1999; GAMA, 2000).

Com o objetivo de favorecer o crescimento axonal no interior dos tubos, várias substâncias são utilizadas como preenchimento deste, como por exemplo, colágeno (INADA et al., 2007), laminina (TOBA et al., 2002), ácido hialurônico (MOHAMMAD et al., 2000), glicosaminoglicanos (CHAMBERLAIN et al., 2000), matrix combinadas com fatores neurotróficos (OLIVEIRA; PIERUCCI; PEREIRA, 2004), além de fatores de crescimento (AEBISCHER; SALESIOTIS; WINN, 1989; DANIELSEN et al., 1988) e tecido adiposo (MORAES, 2009; ROSA-JUNIOR, 2010).

Inúmeros fatores interferem na regeneração nervosa, como a natureza e o nível da lesão, o tempo de desnervação, tipo e diâmetro das fibras nervosas afetadas, a idade do indivíduo e o tempo entre a lesão e o reparo cirúrgico (SANDERLAND, 1985; MENDONÇA; BARBIERI; MAZZER, 2003; MONTE-RASO et al., 2006; ORSINI et al., 2008).

Após uma lesão nervosa, diversos eventos degenerativos iniciam-se, ocorrendo à fragmentação do axônio e da bainha de mielina (BURNETT; ZAGER, 2004), bem como alterações morfológicas e histológicas na biologia do músculo alvo, entre elas, a diminuição de massa muscular, invasão de tecido conjuntivo e adiposo, diminuição do diâmetro e da força muscular (LIEBER, 2002; JACKMAN; KANDARIAN, 2004; RODRIGUES et al., 2007; DELISTOIANOV et al., 2008; MALYSZ et al., 2011).

As lesões nervosas periféricas afetam diretamente as funções musculares, uma vez que interrompe a comunicação neuromuscular e gera fatores degenerativos e que comprometem a sua função (SOUCY; SEBURN; GARDINER, 1996).

Para que ocorra uma boa recuperação funcional e motora após lesão nervosa, os axônios precisam atingir seus músculos alvos, o que depende de vários fatores como, o grau com que as lâminas basais foram retidas, suprimento vascular e invasão de tecido conjuntivo (CARLSON; FAULKNER, 1983; FAWCETT; KEYNES, 1990).

O reparo muscular envolve a remoção de componentes celulares lesados e a proliferação e ativação de células satélites para a construção de novos miotubos (ALFREDO et al., 2009).

Para isso, a presente dissertação propõe a utilização do tubo de polietileno poroso na técnica de tubulização, utilizando o tecido adiposo como substrato de preenchimento para este tubo, como forma de orientação axonal na regeneração de nervo isquiático, visando à recuperação muscular.

2 Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões nervosas periféricas

Em geral, lesões traumáticas nervosas são muito comuns, especialmente em acidentes automobilísticos, lacerações, contusões ou fraturas ósseas e compõem cerca de 30% das lesões nervosas graves (CAMPBELL, 2008).

Essas lesões atingem as estruturas nervosas de várias maneiras, podendo lesar o nervo como um todo, seccionando-o, ou apenas comprometendo alguns de seus componentes.

Nervos são cordões esbranquiçados formado por fibras nervosas unidas por tecido conjuntivo (DANGELO; FATINI, 2006). São três as bainhas conjuntivas que constituem um nervo: epineuro, perineuro e endoneuro (MACHADO, 2004) (Fig.1). Estas são responsáveis pela proteção e resistência, além de cada uma apresentar uma estrutura individual e peculiar nas funções de nutrição e ainda manter a integridade das fibras nervosas (SUNDERLAND, 1965).

O endoneuro é a mais delicada camada de tecido conjuntivo, que se encontra sobre cada fibra nervosa, constituída por fibroblastos, capilares e fibras colágenas dispostas longitudinalmente (SUNDERLAND, 1965).

O perineuro é uma fina camada, porém densa, que envolve determinado número de fibras, constituindo assim um fascículo nervoso (SUNDERLAND, 1965; OLDFORS; JOHASSON, 1979).

Já o epineuro é uma densa bainha conjuntiva que envolve todo o nervo, constituída por fibras colágenas e elásticas, além de mastócitos, macrófagos e fibroblastos (SUNDERLAND, 1965).

Fonte: <http://antranik.org/fundamentals-of-the-nervous-system-and-nervous-tissue>
 Figura 1 - Representação esquemática de um nervo e suas estruturas.

As lesões nervosas podem ser classificadas de acordo com o grau de comprometimento do nervo e de suas estruturas.

Segundo Seddon (1943) as lesões podem ser classificadas como: neuropraxia, axonotmese e neurotmese (Fig. 2).

A neuropraxia é a forma menos grave de lesão do nervo periférico, onde ocorre uma contusão do nervo, mas a continuidade da bainha epineuro e dos axônios se mantém. Este tipo de lesão pode ser provocado por um trauma ou isquemia local do nervo. Contudo, como a continuidade axonal foi mantida, ocorre recuperação total espontânea da função nervosa em poucos dias ou semanas.

Nas lesões nervosas onde a continuidade do axônio é rompida, mas a continuidade epineural é mantida, dá-se o nome de axonotmese. Este tipo de lesão pode ser provocada por um trauma, esmagamento ou forte tração do nervo. Neste tipo de lesão a regeneração axonal pode ocorrer entre dois a seis meses, uma vez que a bainha epineural continua intacta.

A neurotmeze é a forma mais grave de lesão do nervo, porque ela envolve completa perda de continuidade do nervo. Ela pode ser causada por fraturas ósseas, materiais perfurocortantes (vidros e lâminas de metal), faca ou rompimento por projéteis de arma de fogo. Neste tipo de lesão, pode-se desenvolver uma transecção completa ou parcial do nervo, e o prognóstico para recuperação

espontânea é pobre, a menos que os cotos seccionados estejam bem próximos e com orientação apropriada (HUPP, 2000). Nestes casos, onde o nervo é desconectado, o auto-reparo não é possível, pois ocorre a retração dos cotos proximal e distal, além da invasão de tecido conjuntivo fibroso (WANG et al., 2009). Portanto, o tratamento necessita de intervenção cirúrgica.

Figura 2 - Representação esquemática da classificação dos tipos de lesões nervosas periféricas, segundo Seddon (1943) (ROMÃO, 2011).

A secção de um nervo leva a modificações no corpo celular, nos segmentos proximal e distal à secção, no local da lesão e nos órgãos por ele inervados (MARTINS, 2005a). Tanto a região proximal quanto a distal sofre um processo de degeneração semelhante, porém no coto proximal, a degeneração estende-se apenas até o primeiro nóculo de Ranvier (TERENGHI, 1999; JOHSON; ZOUBOS; SOUCACOS, 2005), podendo causar apoptose, caso a lesão ocorra próxima ao corpo celular (WELCH, 1996; LEE; WOLFE, 2000; BURNETT; ZAGER, 2004). Já no coto distal à lesão, o processo degenerativo ocorre em 48-96 horas após a secção do nervo, e é denominado degeneração Walleriana (LEE; WOLFE, 2000).

Na degeneração Walleriana ocorre a remoção e a reciclagem do axônio e do material mielínico preparando o ambiente por onde os axônios regenerados possam crescer (FAWCETT; KEYNES, 1990; MÜLLER; STOLL, 1999).

A degeneração Walleriana é realizada por macrófagos, que realizam a fagocitose da mielina e do axônio degenerado, além de sintetizar e secretar citocinas para promover a mitose de células de Schwann, que posteriormente tornam-se

fagócitos e auxiliam os macrófagos na degradação da mielina, além de secretar fatores neutróficos que promovem o crescimento axonal (VERDÚ et al., 2000).

2.1.1 Técnica de tubulização

Existem várias opções para o reparo de lesões nervosas do tipo neurotmeze, entre elas a sutura dos cotos seccionados, uso de enxerto autógeno ou a utilização de tubos de material biológico ou sintético (RUTKOWSKI; HEATH, 2002). Porém, quando ocorre a perda de tecido nervoso, não é possível realizar a ligação terminal entre os cotos proximal e distal, pois origina-se um "gap" (espaço) no nervo, sendo necessário tensioná-lo, provocando microlesões no mesmo. Para Ijckema-Paassen et al. (2004) as tensões elevadas nas extremidades unidas podem provocar efeitos inibitórios na regeneração neural, provavelmente devido à isquemia. Por esta razão é necessário o uso de enxertos, a fim de ocupar esse "gap" e orientar o crescimento do axônio, para então favorecer a regeneração nervosa, técnica denominada de "tubulização".

Na técnica de tubulização, utiliza-se um tubo que preenche a lacuna entre os cotos seccionados, para assim realizar a ligação entre as extremidades nervosas (Fig. 3).

Perspectivas inovadoras estão sendo utilizadas no tratamento destes tipos de lesões, como o uso de terapias celulares, fatores de proliferação e diferenciação celular e biomateriais, que são alternativas promissoras para o reparo de tecidos e órgãos lesados (COLOMÉ et al., 2008). Para isso, substâncias são utilizadas no interior dos tubos, criando um microambiente favorável, a fim de promover melhoria na qualidade e velocidade da regeneração nervosa (PINEDO, 2001; BARTH, 2006).

Figura 3 – Representação da técnica de tubulização. Ambas as extremidades nervosas são suturadas às paredes do tubo, que realiza a ligação entre os cotos seccionados (OLIVEIRA; PIERUCCI; PEREIRA, 2004).

2.2 Tecido adiposo

O tecido adiposo é uma parte especializada do conjuntivo, sendo um grande depósito de triglicérides e consequentemente de ácidos graxos, uma vez que uma molécula de triglicerídeo tem três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol. Essa reserva permite ao tecido adiposo realizar o seu principal papel, que é a liberação de energia. Outras células como os adipócitos, fibras de colágeno e elastinas são encontradas neste tecido e são importantes como isolante térmico e no amortecimento de choques mecânicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; LOPES, 2004).

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. A maior parte do tecido adiposo presente em mamíferos adultos é do tipo unilocular. Já as células do tecido adiposo multilocular apresentam muitas gotículas de gordura no citoplasma (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

No feixe vâsculo-nervoso, o tecido adiposo está presente na superfície externa da túnica adventícia, assim, em contato íntimo com o epineuro dos nervos periféricos (MORAES, 2009). Este tecido além de ser permeável a fatores externos é rico em fatores tróficos, como colágeno, laminina e fibronectina, favorecendo um microambiente favorável ao crescimento axonal (FERRARI et al., 1999).

O tecido adiposo é responsável pela produção da neurotrofina, um dos fatores de crescimento neural, o que poderia auxiliar na regeneração nervosa (CHALDAKOV et al., 2004; SORNELLI et al., 2007; RYAN et al., 2008; LIU et al., 2011a).

O tecido adiposo é abundante no corpo humano, de fácil acesso, relativamente dispensável nas cirurgias plásticas e menos invasivo do que a punção da medula óssea (FRASER et al., 2006; OKAMOTO, 2010), por isso vários pesquisadores têm utilizado células-tronco derivadas de tecido adiposo nas pesquisas de bioengenharia de tecidos.

Adams, Arruda e Larkin (2011), utilizaram células-tronco derivadas de tecido adiposo para formação de condutos no reparo de defeito crítico após lesão do nervo periférico, e observaram que o tecido adiposo mostrou uma alternativa eficaz no reparo nervoso.

Lopatina et al. (2011) relatam que o uso de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo induz o tecido de regeneração, acelerando o crescimento dos vasos sanguíneos e nervos.

Por estas razões, pensou-se qual seria o resultado da utilização de tecido adiposo associado a tubo de polietileno poroso para a orientação axonal na recuperação funcional e motora nas lesões nervosas periféricas.

2.3 Músculo estriado esquelético

O sistema muscular esquelético é o maior sistema orgânico do corpo humano, e é especializado para gerar força e movimento de direção específica (STAL, 1994).

O músculo esquelético é um dos tecidos mais ativos metabolicamente, sendo importante para locomoção e postura, e tem sua origem a partir de células mesodermas (DE MORAES; BANKOFF, 2003; BOFF, 2008). É composto por dois componentes principais, as fibras musculares e o tecido conjuntivo (JÄRVINEN et al., 2007).

Os músculos desenvolvem-se inicialmente sem influência neural, porém subsequentemente a atividade do sistema nervoso e a força mecânica interferem no estágio pós-maturação das fibras musculares (KINGHAM et al., 2005).

As fibras musculares são provenientes de células miogênicas chamadas mioblastos que se proliferam, e fundem-se para formar os miotubos e finalmente se diferenciam em fibras musculares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tecido muscular esquelético é formado por células longas, cilíndricas, multinucleadas e contendo muitos filamentos, as miofibrilas. A miofibrila é uma organela específica do tecido muscular e se estendem pelo comprimento total da fibra muscular. A miofibrila possui um arranjo organizado denominado de miofilamentos, que são comumente denominados de filamentos grossos e finos, ou também de filamentos de miosina e actina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A estrutura contrátil é organizada em uma unidade funcional, o sarcômero, que consiste na combinação de filamentos de miosina e actina (PIOVESAN et al., 2009).

As fibras musculares são organizadas em fascículos, envoltos por tecido conjuntivo, que interage estreitamente com as células musculares, agregando-as em conjuntos hierarquicamente organizados, através de bainhas conjuntivas, denominadas de endomísio, perimísio e epimísio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; PIEDADE, 2010) (Fig.4).

Endomísio é a camada mais delicada de tecido conjuntivo, que reveste e separa cada fibra muscular individualmente. O perimísio é uma camada mais fibrosa que o endomísio e envolve grupos de fibras musculares, formando um fascículo; e por fim, envolvendo todo o músculo encontra-se o epimísio, considerada a camada mais resistente e espessa de tecido conjuntivo. Tanto o perimísio como o epimísio, contém quantidades maiores de fibras de colágeno tipo I, já o endomísio é rico em colágeno do tipo III, e relaciona-se diretamente com a lâmina basal, que reveste a célula. O tecido conjuntivo mantém as fibras musculares unidas, permitindo que a força de contração gerada por cada fibra muscular individualmente atue sobre o músculo inteiro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 4 - Diagrama esquemático do tecido muscular e organização do tecido conjuntivo.

A) O tecido conjuntivo no músculo estriado esquelético pode ser organizado por epimísio (em torno do músculo), perimísio (ao redor dos fascículos musculares) e endomísio (que envolve as fibras musculares). B) Seção transversal do tecido muscular, indicando que o perimísio pode ser contínuo com o tendão, enquanto que o endomísio está contido dentro dos fascículos musculares (GILLIES; LIEBER, 2011).

2.4 Músculo estriado esquelético desnervado e reinervado

Os músculos estriados esqueléticos são tecidos dinâmicos que podem alterar suas características fenotípicas e se adaptar a diferentes estímulos, proporcionando melhor adaptação funcional (GOLDSPINK, 2003). Diversos fatores determinam as mudanças nas características fenotípicas musculares, entre eles, o alongamento (GOLDSPINK, 1978), hormônios (TOSCHI et al., 2011), exercício

(ILHA et al., 2007; UDINA; PUIGDEMASA; NAVARRO, 2011), desnervação (ARRUDA et al., 2007) e reinervação (MENDLER et al., 2008).

Após uma lesão nervosa, o axônio sofre mudanças estruturais e funcionais e o axônio passa por um processo de degeneração, seguido por uma tentativa de regeneração. Em consequência da lesão nervosa, ocorre uma mudança drástica nas fibras musculares gerando uma diminuição do volume muscular, devido atrofia progressiva das fibras, uma substituição por tecido conjuntivo (SIQUEIRA, 2007), diminuição ou ausência da síntese protéica e ao aumento da proteólise miofibrilar, acompanhadas pelo aumento de proteases lisossomais e de cálcio (LU; HUANG; CARLSON, 1997). A atrofia muscular varia entre indivíduos e músculos da mesma espécie (EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996).

Kasper, Talbot e Gaines (2002) afirmam que quando a fibra muscular diminui sua área transversal, os núcleos se encontram com mais frequência no centro das fibras musculares. Este fato é explicado por Bowden e Gutmann (1944), onde observaram que a movimentação do núcleo da periferia para o centro é imposta como forma de preservação da fibra muscular.

De acordo com Schmalbruch e Lewis (2000) os músculos desnervados após 10 semanas, apresentam núcleos de 20 a 60% a menos que o músculo normal.

Minamoto (2007) observou que músculos lentos, como o sóleo, quando submetidos à desnervação, apresentam degeneração da linha Z em estágios tardios. Por outro lado, em músculos rápidos, como o extensor longo dos dedos (EDL), a linha Z degenera-se em estágios precoces, diferença que se deve ao conteúdo proteico de miosina entre os tipos de fibras musculares.

No primeiro mês após uma desnervação há uma perda no peso muscular de 30%, no segundo mês de 60%, mas com a atrofia muscular, essa perda chega de 60% a 80% em 4 meses (LEE; WOLFE, 2000). Minamoto (2007) diz que se a desnervação persistir, o peso muscular diminui de 5% a 25%, ocasionando uma redução das proteínas contráteis e substituição por tecido conjuntivo.

A atrofia muscular por desnervação aumenta a quantidade de tecido conjuntivo no endomísio e perimísio em torno de 50% a 700% (JÓZSA, 1990). Portanto para uma recuperação muscular completa, é preciso existir um equilíbrio entre a regeneração das células musculares e dos componentes do tecido conjuntivo (HURME; KALIMO, 1992). Fator importante porque durante a lesão

nervosa, o tecido conjuntivo forma uma barreira afetando o crescimento axonal durante a reinervação, e contribuindo para a diminuição na circulação sanguínea no músculo (JÄRVINEN, 1977; LU; HUANG; CARLSON, 1997).

Alguns fatores têm sido propostos para explicar a recuperação muscular após a desnervação. O primeiro, é que durante a regeneração ocorre o aumento de tecido conjuntivo e fragmentação da lâmina basal da célula de Schwann, ocasionando o não crescimento dos brotos nervosos (GUTMANN; YOUNG, 1944; SUNDERLAND; BRADLEY, 1950). Portanto, a restauração da função motora só é possível se um número significativo de axônios motores reinervar as fibras musculares e atingir a placa neuromuscular (DESOUCHES et al., 2005; KRUEGER-BECK et al., 2011). Outro fator, é que os músculos desnervados, podem se tornarem menos receptivos aos axônios motores que chegam ao músculo, ocasionando uma perda das fibras musculares e das células satélites (BAIN et al., 2001). Portanto as fibras musculares só se regeneram completamente, se a célula satélite permanecer ileso após a lesão (PINTÉR; MENDLER; LÁSZLÓ, 2003).

Uma característica importante dos músculos esqueléticos é a sua capacidade de se regenerar após uma lesão, e as células satélites são responsáveis e indispensáveis para o processo de regeneração do músculo esquelético (CARLSON; FAULKNER, 1983; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004).

Células satélites são células mononucleadas indiferenciadas que se localizam entre lâmina basal e o sarcolema (SCHULTZ; McCORMICK, 1994) e são assim denominadas por sua localização anatômica na periferia das fibras musculares (FOSCHINI; RAMALHO; BICAS, 2004).

No tecido muscular normal as células satélites permanecem em estado de quiescência (repouso) (YABLONKA-REUVENI; RIVERA, 1994). Mas em resposta a estímulos como o crescimento, remodelação ou trauma, as células satélites se tornam ativas, se proliferando por divisão mitótica e se fundem para formar novas fibras musculares (MALAMAN, 2006).

Após uma desnervação do músculo, ocorre um aumento na proliferação e diferenciação das células satélites (ANZIL; WERNIG, 1989; DEDKOV et al., 2001), gerando um aumento destas células na fase aguda, e depois, na fase crônica, ocorre um decréscimo significativo das mesmas (FOSCHINI; RAMALHO; BICAS, 2004).

A desnervação prolongada leva a uma perda das fibras musculares (VICENT et al., 2004), e isso ocorre porque a ativação acelerada das células satélites esgota o conjunto de células-tronco miogênicas (RODRIGUES; SCHMALBRUCH, 1995).

A ativação de células satélites também conhecido como mioblastos, expressam vários marcadores miogênicos, como a MyoD e a miogenina, que são membros de uma família de fatores regulatórios miogênicos e são marcadores para células satélites (MEGENEY; RUDNICKI, 1995).

A miogenina e a MyoD tem uma função primária na miogênese, importante na ativação dos mioblastos (HUGHES et al., 1993). A MyoD é considerada um MRFs (Myogenic Regulatory Factors) primário enquanto a miogenina, um fator secundário. Os MRFs primários são responsáveis pela etapa de determinação, comprometendo as células proliferativas dos somitos com a linhagem miogênica. Já os MRFs secundários atuam na diferenciação dos miócitos e maturação das miofibras (EMERSON, 1993; ARNOLD; BRAUN, 2000; PURI; SARTORELLI, 2000; SABOURIN; RUDNICKI, 2000).

Dasarathy et al. (2007) afirmam que a reinervação pode induzir a ativação de células satélites e que a expressão aumentada de myoD é um indicador de proliferação destas células. No processo de miogênese, os miócitos mononucleados se fundem para formam osmiotubos, e no animal adulto, o músculo esquelético torna-se um tecido especializado caracterizado por fibras musculares multinucleadas (SCHMALBRUCH; LEWIS, 2000) (Fig.5).

Figura 5 - Rede regulatória da diferenciação muscular (AGUIAR, 2008).

Outros trabalhos também mostram que os fatores de regulação miogênica desempenham um papel importante na regeneração do músculo estriado esquelético, como forma de evitar a atrofia muscular (HYATT et al., 2003; ZHOU et al., 2006; CHEN et al., 2010; CHEN et al., 2011).

2.5 O músculo esquelético e seus tipos de fibras

Inicialmente os pesquisadores achavam que as fibras musculares eram todas semelhantes entre si (RANVIER, 1874). Os primeiros estudos envolvendo o tecido muscular classificavam os músculos em “vermelhos” ou “brancos” (RANVIER, 1873), de acordo com a presença do pigmento mioglobina e com o grau de vascularização do músculo (RANVIER, 1874). Posteriormente, com a técnica de histoquímica, observou-se que a maioria dos músculos estriados esqueléticos era composta por uma população heterogênea de fibras, e estas apresentam características genéticas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas (DUBOWITZ; PEARSE, 1960).

A composição dos diferentes tipos de fibras musculares é quem determina sua capacidade funcional (CORNACHIONE et al., 2011).

As respostas fisiológicas e bioquímicas podem não serem iguais para os diferentes tipos de fibras, permitindo assim que as mesmas sejam classificadas e diferenciadas quanto à sua função (FLÜCK; HOPPELER, 2003).

Cada sarcômero é formado por várias proteínas, dentre elas, as proteínas contráteis, miosina e actina. A miosina por sua vez é formada por polipeptídeos, denominadas de cadeias pesadas (MHC - myosin heavy chain) e cadeias leves (MLC, myosin light chain) (LOWEY et al., 1969; WEEDS; LOWEY, 1971; ELLIOTT; OFFER, 1978). A contração muscular ocorre após a hidrólise do ATP, pela enzima ATPase miofibrilar no sarcômero (LOWEY et al., 1969). A porção globular da MHC representa o componente essencial para o mecanismo de geração de força do músculo (VECHETTI-JÚNIOR, 2011).

A velocidade de contração de um músculo está diretamente relacionada à atividade da enzima ATPase miofibrilar, apresentando portanto, uma alta correlação

entre o tipo de fibra, baseado na atividade da mATPase, com as isoformas e especificidade da MHC (WEISS; SCHIAFFINO; LEINWAN, et al., 1999; KIM et al., 2011a).

Para Pette e Staron (2000) as formas que oferecem maior fidelidade para a classificação das fibras musculares baseiam-se no perfil protéico da cadeia pesada da miosina, sendo que as técnicas mais utilizadas são: o método histoquímico através da análise da atividade da ATPase, imunohistoquímico com anticorpos específicos para a MHC e a análise eletroforética das isoformas da MHC.

A análise histoquímica baseia-se no fundamento em que a enzima ATPase tem como função hidrolisar o ATP durante o processo de contração muscular (BOFF, 2008).

Diversos métodos surgiram para classificar as fibras musculares, entre eles o proposto por Padykula e Herman (1955) que de acordo com a sensibilidade do pH, classificou em fibras do tipo I e II, pois eram estáveis em meio ácido e básico, respectivamente. Posteriormente as fibras foram subdividas em I, IIA, IIB e IIC por Brooke e Kaiser (1970) e em tipo IIX por Schiaffino (1989) que identificou este subtipo em músculo diafragma de ratos.

Peter et al. (1972) determinaram outra terminologia para a classificação dos tipos de fibras musculares, utilizando um método bioquímico que investiga as enzimas oxidativas e glicolíticas. Estes autores classificaram as fibras musculares rápidas como FG (fast twitch glycolytic) e FOG (fast twitch glycolytic oxydative), e as fibras lentas como SO (slow twitch oxydative).

Os diferentes tipos de fibras musculares estão relacionados com sua inervação padrão (PETTE; STARON, 1990; PETTE; VRBOVÁ, 1992). Neste sentido, a atividade neuromuscular é importante para manter ou alterar o fenótipo muscular, podendo interferir na adaptação do músculo (BOFF, 2008).

Pesquisas demonstram que as fibras musculares têm capacidade de alterar seu fenótipo muscular, suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, em resposta a vários estímulos externos e internos (BOFF, 2008), como alterações hormonais (HUGHES et al., 1993), exercício físico (HUGHES et al., 1999), idade (PICARD et al., 2011), imobilização (DU et al., 2011), estimulação elétrica (GREGORY et al., 2005), desnervação (LAPALOMBELLA, 2008; CHEN, 2010) e reinervação (ZHOU et al., 2006).

2.6 Análise funcional da marcha

Lesões de nervos periféricos são comuns na prática clínica e muitas vezes resultam em déficit funcional a longo prazo (KOKA; HADLOCK, 2001).

Inúmeros métodos são propostos para avaliar a recuperação funcional na lesão nervosa, e para os membros pélvicos um dos mais utilizados é a análise da marcha (BOBINSKI et al., 2011; DORNSEIFER et al., 2011; LI et al., 2011; LIAO et al., 2011).

A análise da marcha foi utilizada pela primeira vez por Jolicoeur et al. (1979), usando papel e tinta para manchar as patas traseiras e observar a forma da marca deixada pela mesma.

Hruska, Kennedy e Silbergeld et al. (1979) desenvolveram um outro método relativamente simples para o estudo analisar a marcha em modelos animais, com neuropatias que causavam disfunções na locomoção. Sua análise do padrão normal da marcha dos ratos indicava que a locomoção livre e espontânea nos animais era altamente consistente e de fácil quantificação.

Em 1982, De Medinaceli; Fred e Wyatt, desenvolveram um método quantitativo de análise funcional do nervo isquiático em ratos, conhecido como índice funcional do isquiático (IFI), baseado nas diversas medidas das pegadas feitas em filme de raio-x. De posse das impressões foram efetuadas as seguintes medições: distância ao pé oposto (TOF); comprimento da pegada (PL); distância do primeiro e quinto dedos (TS); e distância entre o segundo e quarto dedos (IT) (Fig.6).

Figura 6 - Representação esquemática para calcular a análise funcional da marcha (ROMÃO, 2011).

Uma técnica mais complexa para calcular o índice funcional do isquiático (IFI) foi descrito por Lowdon et al. (1988) usando papel xerox e azul de bromofenol para a marcação da pata do animal, porque o papel xerox proporciona uma melhor aderência do que o filme de raio-x.

Em 1989, Bain, Mackinon e Hunter relataram que o IFI, como descrito por De Medinaceli, Fred e Wyatt (1982) levava a valores que não eram indicativos das lesões nervosas produzidas experimentalmente, portanto eles 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 utilizando ratos Wistar. Para isso os animais dos grupos experimentais tiveram o nervo alvo seccionado, e os cotos dos mesmos colocados em direção oposta. Eles obedeceram às seguintes regras: a lesão seria produzida experimentalmente em um dos ramos do nervo, mas os demais seriam preservados; e o lado experimental seria escolhido ao acaso, em cada animal. Sendo proposto que, um IFI de 0 (zero) é considerado normal. E um IFI de - 100 (cem) indica comprometimento total, como seria resultado de uma transecção completa do nervo isquiático.

Dois métodos foram recentemente introduzidos para avaliar a recuperação funcional dos nervos. Um proposto por Puigdemívol-Sanchez et al. (2000) na qual injetavam traçadores fluorescentes retrógrados antes e após a lesão do nervo periférico, como uma ferramenta para investigar a precisão de regeneração sensorial e motora. Outro por Varejão et al. (2002) que descreveram uma análise

computadorizada, usando vídeo da marcha de ratos, utilizando um modelo biomecânico do pé e do tornozelo, que permite uma avaliação quantitativa e descrição do ângulo do tornozelo, refletindo os movimentos plantar e dorsiflexão durante a fase de apoio da marcha.

Vários pesquisadores concordam que o fator mais importante para avaliação da recuperação funcional do nervo é a escolha do método que proporcione uma avaliação mais adequada, não invasiva, fidedigna e de fácil reprodução (VAREJÃO et al., 2002; MONTE-RASO, 2006; COSTA; CAMARGO; ANDRÉ, 2008).

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

Considerando o exposto anteriormente pensou-se na realização desta pesquisa com os seguintes objetivos:

a-) verificar se o uso do tubo de polietileno poroso usados na técnica de tubulização influenciariam na reinervação de músculos de contração lenta e rápida, de ratos;

b-) verificar se o preenchimento com tecido adiposo do tubo de polietileno poroso usados na técnica de tubulização influenciariam na reinervação de músculos de contração lenta e rápida, de ratos;

c-) verificar qual das duas técnicas anteriores (com preenchimento e sem preenchimento) produzem melhor resultado na reinervação de músculos de contração lenta (sóleo);

d-) verificar qual das duas técnicas anteriores (com preenchimento e sem preenchimento) produzem melhor resultado na reinervação de músculos de contração rápida (EDL).

Para isso foram verificados:

1-) área das fibras dos músculos sóleo e EDL coradas com HE;

2-) área dos diferentes tipos de fibras que formam os músculos sóleo e EDL;

3-) quantidade de tecido conjuntivo entre as fibras dos músculos sóleo e EDL, em lâminas coradas com Tricrômico de Masson;

4-) quantidade de expressão de miogenina nas fibras dos músculos sóleo e EDL;

5-) quantidade de expressão de MyoD nas fibras dos músculos sóleo e EDL;

6-) análise funcional da marcha por meio do índice funcional do nervo isquiático (IFI).

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Características Morfológicas dos tubos de Polietileno Poroso:

Os tubos de Polietileno Poroso foram confeccionados a partir de informações colhidas em outros artigos já descritos em literatura. Todavia, no presente trabalho realizou alterações no modelo tradicional, como por exemplo, a implantação dos poros e aumento do comprimento do para 12 mm (Fig.7 e 8). O tubo foi confeccionado pela empresa de materiais ENGIMPLAN (Rio Claro, São Paulo, Brasil), e os poros foram realizados a laser pelo Departamento de Física da Universidade de São Paulo na cidade de São Carlos, gentilmente coordenada pelo Professor Doutor Marcelo Andretta.

Figura 7 - Demonstração esquemática das dimensões do tubo de Polietileno Poroso.

Figura 8 - Demonstração esquemática da disposição dos poros no tubo de Polietileno Poroso.

4.2 Animais utilizados

Foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, jovens, machos, com 80 dias de idade, pesando em média 250g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB – USP), Campus de Bauru – SP.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas com cinco animais em cada uma, recebendo água e ração “*ad libitum*”, respeitando ciclos de 12 horas de luz, em temperatura média de 24 °C.

Esse estudo foi realizado de acordo com os Princípios éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (ANEXO A e B).

Os 45 animais foram distribuídos em cinco grupos, sendo, três controles, e dois experimentais, assim constituídos:

Grupo Controle Inicial (GCI): Constituído de 7 animais, que foram sacrificados com oitenta dias de vida.

Grupo Controle Final (GCF): Constituído de 7 animais, que foram sacrificados com cento e cinquenta dias após início do experimento, totalizando 230 dias de vida.

Grupo Controle Desnervado (GCD): Constituído de 7 animais que foram submetidos à cirurgia para secção do nervo isquiático. A descrição desta cirurgia está em tópico do procedimento cirúrgico.

Grupo Experimental com Enxerto de Polietileno sem preenchimento (GESP): Constituído de 12 animais que foram submetidos à cirurgia de tubulização, como descrito no tópico do procedimento cirúrgico, e os tubos usados nos “gaps” não foram preenchimento com tecido adiposo. Estes animais foram sacrificados cento e cinquenta dias após o início do experimento, totalizando 230 dias de vida.

Grupo Experimental Enxerto de Polietileno com preenchimento de Tecido Adiposo (GECP): Constituído de 12 animais que foram submetidos à cirurgia de tubulização, como descrito no tópico do procedimento cirúrgico, e os tubos usados nos “gaps” foram preenchimento com tecido adiposo. Estes animais foram sacrificados cento e cinquenta dias após o início do experimento, totalizando 230 dias de vida.

Observações ao número de animais do grupo experimental: Em vista da morte de 2 animais, a soltura do ponto da sutura do tubo no coto distal, e consequente ausência de regeneração em outros 2 animais, considerou-se os grupos experimentais com 8 animais cada e não 12 animais como descrito inicialmente.

4.3 Anestesia dos animais

Os animais foram anestesiados com injeções intra-musculares, de Cloridrato de Xilazina (10mg/kg - Anasedan[®], Vetbrands, São Paulo, Brasil) associada à Cloridrato de Ketamina (50mg/kg - Dopalen[®], Vetbrands, São Paulo,

Brasil) (Fig.9). A anestesia foi realizada na parte posterior da coxa esquerda do animal.

Figura 9 - Exemplos dos anestésicos utilizados nos procedimentos cirúrgicos.

4.4 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram pesados e submetidos à anestesia conforme descrito anteriormente. Foram adotadas técnicas assépticas em todos os procedimentos cirúrgicos.

Realizou-se a tricotomia da face dorsolateral do membro pélvico direito nos animais submetidos ao procedimento cirúrgico (Fig. 10A).

Figura 10 – A) Realização da tricotomia na face dorsolateral do membro pélvico direito do rato; B) Animal com as patas fixadas em placa de cortiça.

Os animais foram posicionados em decúbito ventral, em uma placa de cortiça, fixando-se as suas patas com o auxílio de uma fita adesiva (Fig.10B). A seguir, efetuou-se uma incisão longitudinal de aproximadamente 2 cm de comprimento na face dorsolateral da coxa direita. Em ato contínuo rebateu-se a pele e a tela subcutânea e os músculos subjacentes para exposição e dissecação do nervo isquiático (Fig.11). Em seguida foi removido um segmento de cerca de 10 mm de comprimento do referido nervo (Fig.15), e neste local foi colocado um enxerto de tubo de polietileno poroso, realizando a tubulização do nervo (Fig. 16).

Nos animais do grupo GESP os tubos usados no “gap” não continham nenhum material em seu interior, e nos animais do Grupo GECP os tubos foram preenchido com tecido adiposo “*in natura*” colhidos nas proximidades do nervo isquiático (Fig. 12, 13 e 14). As suturas dos cotos, proximal e distal, com o enxerto de polietileno poroso, foram realizadas com fio mononylon 10-0 (Ethicon®, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil).

Após a cirurgia, os animais foram colocados em caixas aquecidas por luz incandescente a fim de evitar a hipotermia, até o momento de retornarem da anestesia.

Figura 11 – A) Incisão de 2 cm na face dorsolateral da coxa direita do animal. B) Divulsão dos tecidos subcutâneos e musculatura subjacente, e exposição do nervo isquiático.

Figura 12 – A) Aspecto do tubo de polietileno poroso em comparação a uma lâmina de bisturi número 11. B) Demonstração da remoção do tecido adiposo “*in natura*” que, posteriormente, foi utilizada no GECP.

Figura 13 – A) Vista da secção transversal do tubo de polietileno poroso, podemos notar a espessura de sua parede; B) Imagem revelando a inserção do tecido adiposo autógeno no interior do tubo do GECP.

Figura 14 – A) Tecido adiposo exposto em recipiente com soro fisiológico 0,9%; B) Preenchimento com tecido adiposo, sem obliterar totalmente o lume do tubo de polietileno.

Figura 15 – Nervo isquiático seccionado cirurgicamente.

Figura 16 – Tubo do grupo GECP, fixado em suas extremidades com fio mononylon 10.0. Note por transparência a presença do tecido adiposo recostado na parede lateral do tubo.

4.5 Processamento para coleta de amostras e criopreservação

Para a coleta das amostras musculares, os animais foram sacrificados com dose excessiva de anestésico (três vezes o valor da dose descrita anteriormente na anestesia dos animais).

Para a remoção dos músculos sóleo e EDL, foi realizada uma incisão na pele e tela subcutânea da região ventro-medial do membro pélvico direito, para exposição, e retirada dos mesmos.

Os músculos foram reduzidos a amostras de 1,0 cm de comprimento por 0,5 cm de espessura da porção média dos músculos, acompanhando o sentido longitudinal das suas fibras musculares.

As amostras foram envoltas em talco neutro, em seguida embebido em meio para congelamento Tissue-Tek® (O.C.T., Sakura Finetek, Torrance, USA) no interior de um blister (material de armazenamento de cápsulas de remédios), e

imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido até cessar a efervescência (WERNECK, 1981) (Fig.17).

Após o congelamento, as amostras foram armazenadas a -80°C em um freezer (INDREL[®], IULT 2430, Londrina, Paraná, Brasil) para posterior processamento.

A seguir iniciou-se o tratamento histológico das amostras musculares, obtendo-se, com auxílio de criostato (Leica[®], CM 1850, Nussloch, Alemanha), cortes de $10\mu\text{m}$ de espessura, que foram e armazenados no freezer a -80°C até sua utilização.

Figura 17 – A) Amostras musculares envoltas por talco neutro; B) Amostras musculares em blister para congelamento em nitrogênio líquido.

4.6 Colorações de HE e Tecido conjuntivo

Os cortes obtidos dos músculos sóleo e EDL, foram corados pela Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson para a avaliação das características morfológicas como: morfologia, posição dos núcleos e invasão de tecido conjuntivo.

4.7 Histoquímica para m-ATPase e NADH:

Os cortes de $10\mu\text{m}$ de espessura obtidos das amostras musculares foram submetidos às técnicas de histoquímica para verificar se ocorreram modulação e

alteração nas áreas dos diferentes tipos de fibras, entre os diferentes grupos estudados.

As lâminas histológicas de ambos os músculos foram submetidas às reações de Adenosina Trifosfato Miofibrilar (m-ATPase) de acordo com Padykula e Herman (1955), com pré-incubações alcalina (em pH 10,4) e ácida (em pHs 4,35 e 4,6) conforme Brooke e Kaiser (1970), e a reação de Nicotinamida Adenina Tetrazólio Reductase (NADH-Tr), segundo a metodologia de Pearse (1968), modificada por Dubowitz e Neerunjun (1973).

4.8 Processamento para análise morfométrica

A análise morfológica e morfométrica das fibras dos músculos sóleo e EDL foram realizadas utilizando-se um micro computador (Processador INTEL® CORE™ QUAD, 2.4GHz, 2.0Gb de RAM, Santa Clara, Califórnia, USA) com o software de captura e análise de imagem Image Pro-plus® 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA), acoplado ao microscópio óptico (Olympus®, BX-50, Tóquio, Japão).

Para a classificação das fibras musculares em fibras de contração rápida e com metabolismos glicolíticas (FG), fibras de contração rápida com metabolismo oxidativo e glicolítico (FOG) ou fibras de contração lenta com metabolismo oxidativo (SO), foram obtidas imagens, por meio dos equipamentos citados anteriormente, expostas em quatro monitores de tela plana (21 polegadas) que estavam ligados ao computador (Fig. 18A), auxiliando na visualização simultânea dos mesmos campos obtidos nos diferentes tipos de reação histoquímica (m-ATPases em pH 4,35; 4,6; 10,4 e NADH). Duzentas e vinte fibras musculares de cada corte histológico examinado foram classificadas e tiveram as suas áreas de secção transversal calculadas (Fig. 18B).

Para a percentagem de tecido conjuntivo, foi realizada a mensuração da área total do músculo e da área total de tecido conjuntivo invasivo.

Figura 18 – A) Microscópio, microcomputadores e monitores para análise de imagens e morfometria; B) Demonstração da análise morfométrica das fibras musculares.

Para análise da expressão de fatores regulatórios miogênicos (MRFs), myoD e miogenina, foi realizada uma contagem e marcação dos núcleos expressos, a fim de evitar a dupla marcação, e uma contagem da quantidade de fibras musculares para demonstrar a percentagem de núcleos expressos de acordo com White et al. (2000).

4.9 Imunofluorescência

Os cortes armazenados no freezer -80°C foram retirados e mantidos em temperatura ambiente (TA) por 30 minutos, e fixados em acetona (Sigma[®] Chemical Companies, St. Louis, MO, USA) a -20°C por 10 minutos no congelador. Depois de fixados, as lâminas foram lavadas com solução de salina-fosfato tamponada (PBS - pH 7,2) por 10 vezes a 3 minutos cada banho. A inibição da peroxidase endógena foi feita com 3% peróxido de hidrogênio (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) por 20 minutos, posteriormente lavadas em PBS (pH 7,2) e incubadas com leite Molico[®] (Nestlé Brasil, Araçatuba, São Paulo, Brasil) 5% + BSA 1% (Bovine Serum Avidin, Sigma[®] Chemical Companies, St. Louis, MO, USA) 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[®], Califórnia, USA) e deixadas overnight a 4°C . Foram utilizados anticorpos primários contra MyoD

(anticorpo policlonal de coelho anti-myod, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA, código sc-760, diluição 1:100) e contra Miogenina (anticorpo policlonal de coelho anti-miogenina, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA, 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 (Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA, código sc-3739 na diluição 1:100) no caso quando utilizado primário contra miogenina; e camundongo anti-coelho IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA, código sc-2359 na diluição 1:100), quando utilizado primário contra MyoD, 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® Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A) 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).

4.10 Imunohistoquímica

Os cortes armazenados no freezer -80°C foram retirados e mantidos em temperatura ambiente (TA) por 30 minutos, e fixados em acetona (Sigma® Chemical Companies, St. Louis, MO, USA) a -20°C por 10 minutos no congelador. Depois de fixados, as lâminas foram lavadas com solução de salina-fosfato tamponada (PBS - pH 7,2) por 10 vezes a 3 minutos cada banho. A inibição da peroxidase endógena foi feita com 3% peróxido de hidrogênio (Merck®, Darmstadt, Alemanha) por 20 minutos, posteriormente lavadas em PBS (pH 7,2) e incubadas com leite Molico® (Nestlé Brasil, Araçatuba, São Paulo, Brasil) 5% + BSA 1% (Bovine Serum Avidin, Sigma® Chemical Companies, St. Louis, MO, USA) por 60 minutos em temperatura ambiente para bloqueio de ligação inespecífica. Em seguida as lâminas foram novamente lavadas com PBS (pH 7,2), sendo três banhos de 5 minutos cada. Após, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário diluídos em Diluente de

Anticorpo (Dako®, Califórnia, USA) e deixadas overnight a 4°C. Foram utilizados anticorpos primários contra MyoD (anticorpo policlonal de coelho anti-myod, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA, código sc-760, diluição 1:100) e contra Miogenina (anticorpo policlonal de coelho anti-miogenina, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA, 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 IgG-B cabra anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA, código sc-2040 na diluição 1:100), por um período de 45 minutos, em seguida lavado com PBS (pH - 7,2, três vezes, por 5 minutos cada). As lâminas foram incubadas em Streptoavidina (Dako®, Califórnia, USA) por 30 minutos e novamente lavadas com PBS (pH - 7,2, três vezes, por 5 minutos cada). A revelação foi realizada com Liquid DAB Substrate (Dako®, Califórnia, USA) a 0,05% entre 1 a 5 min, bloqueando com água destilada. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina e em seguida desidratadas e diafanizadas para a montagem da lâmina.

4.11 Análise Funcional da marcha

Foram selecionados aleatoriamente 3 animais de cada grupo, antes de serem sacrificados, para serem submetidos à avaliação funcional do nervo isquiático (Fig.19). Para tanto, 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 (Fig.20A), colocou-se uma faixa de papel para que os animais caminhassem e deixassem as impressões durante a marcha (Fig.20B). Este procedimento foi repetido duas vezes com cada animal.

As impressões dos membros posteriores obtidas nas faixas de papel foram avaliadas segundo a equação de Bain, Mackinnon e Hunter (1989), com base nos resultados de De Medinaceli; Fred e Wyatt (1982), que 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 e 2):

$$FatorGerado = \frac{ValorExperimental - ValorNormal}{ValorNormal} \quad (1)$$

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)

Figura 19 – Valores das medições e fatores para a análise funcional do nervo isquiático (YAMASITA, 2007).

Para tanto, foram efetuadas as seguintes medições:

- 1-) Distância ao pé oposto (TOF);
- 2-) Comprimento da pegada (PL);
- 3-) Distância entre a pegada e a linha média da marcha (PA);
- 4-) Distância do primeiro ao quinto dedos (TS);
- 5-) 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.

Na análise, foi utilizada a regressão como o déficit do nervo, 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).

As impressões de difícil análise, causadas pela má impressão da tinta no papel foram descartadas, e as demais foram escaneadas e digitalizadas, obedecendo a um padrão de calibração para cada imagem. Realizou-se as medições com auxílio do programa Image Pro-plus® 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA), e os dados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico obedecendo ao índice $P < 0,05$ para todas as amostras.

Figura 20 – A) Canaleta de madeira utilizada para realização do teste de avaliação funcional do nervo isquiático; B) Impressão da região plantar das patas posteriores em faixa de papel.

4.12 Tratamento Estatístico

Análises entre os grupos, como os dados relativos à morfometria de HE, mATPase, Imunohistoquímica e Análise funcional do isquiático passaram pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e foram submetidos ao teste de Análise de Variância a um critério, seguido pelo teste de comparações múltiplas (Tukey) quando o primeiro apresentava diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Para a análise para a percentagem de tecido conjuntivo, como os dados não passaram pela curva de normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, também seguido pelo teste de Tukey para as análises *Post hoc*. Para todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Todos os testes estatísticos foram aplicados através do programa SigmaPlot® 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização morfológica das fibras submetidas à coloração com HE, reações de mATPase e NADH

5.1.1 Coloração com HE

Observações comuns aos músculos sóleo e EDL

a-) nos animais do GCI e GCF as fibras musculares em um corte transversal possuía um padrão fascicular normal, delimitado pelo perimísio e cada fibra era circundada pelo endomísio. As fibras possuíam contornos poligonais, tendo os núcleos em posições periféricas (Fig. 21 e 22);

b-) nos animais do GCD as fibras musculares apresentaram alterações morfológicas, como atrofia e desorganização, e não foi possível realizar a morfometria neste período de tempo (Fig. 21C e 22C);

c-) nos animais dos grupos GCD, GESP e GECP pode-se observar que alguns núcleos periféricos migraram para a parte central da fibra muscular (Fig. 23).

Figura 21 – Fotomicrografia do músculo sóleo corados em HE dos grupos: A) GCI; B) GCF; C) GCD; D) GESP; E) GECP (Aumento 400x).

Figura 22 – Fotomicrografia do músculo EDL corado em HE dos grupos: A) GCI; B) GCF; C) GCD; D) GESF; E) GECP (Aumento 400x).

Figura 23 - Fotomicrografia das fibras musculares normais e reinervadas coradas em HE, demonstrando: A) Fibras reinervadas (GESp), com a presença de núcleos centrais (seta branca); B) Fibras com morfologia normal e núcleos localizados na periferia. Note a presença de um fuso neuromuscular (seta preta) (Aumento 400x).

Os dados da média da área das fibras dos músculos sóleo e EDL estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 - Média da área (μm^2) e desvio padrão (D.P) dos músculos sóleo e EDL.

GRUPOS	ÁREA HE (μm^2)			
	ÁREA SÓLEO		ÁREA EDL	
	Média	D.P	Média	D.P
GCI	1.719,7 ^a	87,4	1.329,7 ^a	140,1
GCF	3.857,0 ^b	171,8	3.094,9 ^b	287,9
GESp	2.129,8 ^c	205,4	1.882,3 ^c	172,6
GECP	2.408,3 ^c	232,7	2.238,9 ^d	187,5

a,b,c,d – Comparação entre os grupos (vertical). Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Observando-se os dados da tabela 1 nota-se que:

a-) no músculo sóleo o tamanho das fibras pode ser representado por $\text{GCF} > \text{GECP} = \text{GESp} > \text{GCI}$;

b-) no músculo EDL o tamanho das fibras pode ser representado por $\text{GCF} > \text{GECP} > \text{GESp} > \text{GCI}$;

c-) nos experimentais GESp e GECP, em ambos músculos, a área das foi maior do que do GCI e menor do que o GCF;

d-) no músculo EDL as fibras do GECP foram as que mais se aproximaram do GCF.

Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Figura 24 - Representação gráfica da média das áreas das fibras musculares do sóleo e EDL (n = 220).

5.1.2 Coloração com m-ATPase.

As amostras dos músculos sóleo e EDL de todos os grupos, com exceção do GCD apresentaram resultados das reações de m-ATPase e NADH semelhantes e estão representados na tabela 2 e nas figuras 25 e 26.

Baseado nestes resultados as fibras musculares puderam ser classificadas em FG, FOG e SO.

Tabela 2 - Resultados das reações de m-ATPase e NADH-Tr a que foram submetidas às amostras dos músculos sóleo e EDL.

Tipos de fibra	m-ATPase			NADH-Tr
	pH 4.35 Figs.25A e 26B	pH 4.6 Figs.25B e 26B	pH 10.4 Figs.25C e 26C	Figs.25D e 26D
SO = 1	+++	+++	+	+++
FG = 2	+	+	+++	+
FOG = 3	++	++	++	++
+ reatividade fraca		++ reatividade moderada		+++ reatividade forte

Figura 25 - Resultado das amostras do músculo sóleo do GECP submetidas a reações histoenzimológicas. A-) m-ATPase ácida, pH4.35; B-) m-ATPase ácida pH 4.6; C-) m-ATPase alcalina pH 10.4; D-) reação NADH-Tr. Sendo: 1= fibras do tipo SO; 2= fibras do tipos FG; 3= Fibras do tipo FOG (Aumento 400x).

Figura 26 - Resultado das reações histoenzimológicas das amostras do músculo EDL do GECP. A) m-ATPase ácida, pH 4.35; B) m-ATPase ácida pH 4.6; C) m-ATPase alcalina pH 10.4; D) reação NADH-Tr. Sendo: 1= fibras do tipo SO; 2= fibras do tipos FG; 3= Fibras do tipo FOG (Aumento 400x).

As fibras dos músculos sóleo e EDL dos animais do GCD apresentaram alterações morfológicas como atrofia e desorganização, se tornando difícil a caracterização do perfil histoenzimológico dos diferentes tipos de fibras e da mensuração da área das mesmas (Fig.27).

Figura 27 - Fotomicrografia das fibras musculares de difícil caracterização do perfil fenotípico do grupo GCD, A) Fibras musculares do músculo sóleo; B) Fibras musculares do músculo EDL (Aumento 400x).

O resultado da morfometria e percentagem dos diferentes tipos de fibras, dos músculos sóleo e EDL, exceto do GCD, estão apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 - Área média (μm^2), desvio padrão (D.P) e percentagem (%) dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo **sóleo** dos grupos estudados.

GRUPOS	Área (μm^2)						Percentagem					
	FG		FOG		SO		FG		FOG		SO	
	(A ²)	D.P	(A ²)	D.P	(A ²)	D.P	(%)	D.P	(%)	D.P	(%)	D.P
GCI	3.075,4 ^a	340	1.965,6 ^A	130	1.286,1 ^α	44	4,1 ^a	1,2	25,6 ^A	4,5	70,3 ^α	5,3
GCF	6.305,3 ^b	566	4.280,9 ^B	211	2.731,2 ^β	208	6,8 ^{ac}	1,6	18 ^A	3,1	75,2 ^α	6,6
GCD	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GESP	3.067,7 ^a	873	2.318,1 ^C	165	1.743 ^{αγ}	577	8,8 ^{bc}	2,2	46,8 ^B	5,8	44,4 ^β	6,4
GECP	3.104,9 ^a	1101	2.149,4 ^{AC}	252	2.010,8 ^{αβγ}	788	11,4 ^{bd}	4,6	48,1 ^B	14,1	40,5 ^β	6,5

a,b,c,d – Letras minúsculas indica comparação das fibras FG entre os grupos (vertical).

A,B,C,D - Letras maiúsculas indica comparação das fibras FOG entre os grupos(vertical).

α,β,γ,δ - Letras gregas indica comparação das fibras SO entre os grupos (vertical).

Letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Observando-se os dados sobre a área dos diferentes tipos de fibras do sóleo na tabela 3 nota-se que:

a-) as fibras do **tipo FG** apresentam maior área nos animais do GCF e que nos grupos experimentais (GESP e GECP) a área deste tipos de fibra foi semelhante às obtidas nos animais do GCI;

b-) as fibras do **tipo FOG** apresentam maior área nos animais do GCF, e que nos animais do GESP ela é maior do que nos animais do GCI;

c-) as fibras do **tipo SO** apresentam maior área nos animais dos GCF e GECP;

d-) os animais dos grupos experimentais que tiveram as áreas mais próximas do GCF nas fibras do tipo FOG foram os do GESP e nas do tipo SO foram as do GECP.

Área média dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo

a,b,c,d – Letras minúsculas indica comparação das fibras FG entre os grupos.
 A,B,C,D – Letras maiúsculas indica comparação das fibras FOG entre os grupos.
 α,β,γ,δ – Letras gregas indica comparação das fibras SO entre os grupos.
 Letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Figura 28 - Representação gráfica da média das áreas dos tipos de fibras do músculo sóleo (n = 220).

Observando-se os dados sobre a percentagem (%) dos diferentes tipos de fibras do sóleo na tabela 3 nota-se que:

a-) Ocorreu um aumento na percentagem das fibras de contração rápida (**FG e FOG**) e diminuição da percentagem das fibras **SO** nos animais do grupos experimentais (GESP e GECP);

b-) Entre os grupos controles (GCI e GCF) não houve diferença na frequência entre os grupos nos diferentes tipos de fibras (FG, FOG, SO) entre si;

c-) Entre os grupos experimentais (GESP e GECP) não houve diferença na frequência entre os grupos nos diferentes tipos de fibras (FG, FOG, SO) entre si.

a,b,c,d – Letras minúsculas indica comparação das fibras FG entre os grupos.
A,B,C,D - Letras maiúsculas indica comparação das fibras FOG entre os grupos.
α,β,γ,δ - Letras gregas indica comparação das fibras SO entre os grupos.
Letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Figura 29 - Representação gráfica da percentagem dos tipos de fibras do músculo sóleo.

Tabela 4 - Área média (em μm^2), desvio padrão (D.P) 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)	D.P	(A ²)	D.P	(A ²)	D.P	(%)	D.P	(%)	D.P	(%)	D.P
GCI	1.856,5 ^a	158,5	970,5 ^A	110	594,1 ^α	132	42,4 ^a	2,4	53 ^A	2,1	4,5 ^α	1,3
GCF	4.037,4 ^b	1000	2.678,9 ^B	410	1.408,7 ^β	178	35,5 ^a	3,9	57,5 ^A	3,3	7 ^{αβ}	1,5
GCD	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GESP	2.743,7 ^{ac}	489	1.665,9 ^C	227	878 ^γ	135	42,3 ^{ab}	11,2	55,2 ^A	11,2	2,5 ^{αγ}	0,6
GECP	3.359,7 ^{bc}	580,8	1.893,4 ^C	165	1.714,9 ^β	608	28,7 ^{ac}	8,3	66,3 ^A	10,7	5 ^α	3,9

a,b,c,d – Letras minúsculas indica comparação das fibras FG entre os grupos (vertical).
A,B,C,D - Letras maiúsculas indica comparação das fibras FOG entre os grupos(vertical).
α,β,γ,δ - Letras gregas indica comparação das fibras SO entre os grupos(vertical).
Letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Observando-se os dados sobre a área dos diferentes tipos de fibras do EDL na tabela 4 nota-se que:

a-) as fibras do **tipo FG** apresentam maior área nos animais do GCF e GECP;

b-) as fibras do **tipo FOG** apresentam maior área nos animais do GCF e que nos animais dos grupos experimentais (GECP e GESP) ela é maior do que nos animais do GCI;

c-) as fibras do **tipo SO** apresentam maior área nos animais dos GCF e GECP e nos animais do GESP ela foi maior do que no GCI;

d-) os animais dos grupos experimentais que tiveram as áreas mais próximas do GCF nas fibras do tipo FG e SO foram os do GECP.

Área média dos diferentes tipos de fibras do músculo EDL

a,b,c,d – Letras minúsculas indica comparação das fibras FG entre os grupos.
 A,B,C,D – Letras maiúsculas indica comparação das fibras FOG entre os grupos.
 α,β,γ,δ – Letras gregas indica comparação das fibras SO entre os grupos.
 Letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Figura 30 - Representação gráfica da média das áreas dos tipos de fibras do músculo EDL (n = 220).

Observando-se os dados sobre a percentagem (%) dos diferentes tipos de fibras do EDL na tabela 4 nota-se que:

a-) nos animais do grupos experimentais as fibras do **tipo FG** apresenta menor frequência nos animais do GECP;

b-) as fibras do **tipo FOG** não apresentaram diferenças nas percentagem entre os grupos estudados;

c-) as fibras do **tipo SO** apresentaram percentagem menor nos animais do GESP;

d-) Não houve diferença na percentagem entre os grupos controles (GCI e GCF) nos diferentes tipos de fibras (FG, FOG, SO);

e-) Entre os grupos experimentais (GESP e GECP) notou-se diferença na percentagem apenas nas fibras do tipo FG;

f-) Entre os grupos experimentais (GESP e GECP) e controles (GCI e GCF) notou-se diferença na percentagem apenas nas fibras do tipo SO.

a,b,c,d – Letras minúsculas indica comparação das fibras FG entre os grupos.
 A,B,C,D - Letras maiúsculas indica comparação das fibras FOG entre os grupos.
 $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - Letras gregas indica comparação das fibras SO entre os grupos.
 Letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Figura 31 - Representação gráfica da percentagem dos tipos de fibras do músculo EDL.

Nas reações de mATPase foram encontradas a presença de grupos de fibras de mesmo perfil fenotípico, frequentemente encontrado em músculos reinervados, denominada de “Type grouping”, como pode ser observadas na figura 32.

Figura 32 - Fotomicrografia da reação mATPase em pH 4,35 evidenciando grupos de fibras de mesmo perfil fenotípico (círculo). A) músculo sóleo do grupo GECP. B) músculo EDL do grupo GECP (Aumento 40x).

5.2 Análise morfométrica do tecido conjuntivo

As lâminas coradas com Tricômico de Masson para quantificar a proporção de tecido conjuntivo em relação às fibras musculares nos músculos sóleo e EDL estão representadas nas Figuras 33 e 34, respectivamente, e na tabela 5.

Figura 33 – Fotomicrografia da invasão de tecido conjuntivo no músculo sóleo dos grupos: A) GCI; B) GCF; C) GCD; D) GESP; E) GECP. Note as fibras musculares (estrela de cinco pontas), fibras musculares em atrofia (seta preta) e invasão de tecido conjuntivo (seta branca) (Aumento 400x).

Figura 34 – Fotomicrografia da invasão de tecido conjuntivo do músculo EDL dos grupos: A) GCI; B) GCF; C) GCD; D) GESp; E) GECp. Note as fibras musculares (estrela de cinco pontas branca), fibras musculares em atrofia (seta preta), fuso muscular (estrela de cinco pontas preta) e invasão de tecido conjuntivo (seta branca) (Aumento 400x).

Tabela 5 - Média da percentagem da área (μm^2) de tecido conjuntivo encontrada nos grupos do músculo sóleo e EDL.

GRUPOS	Percentagem de Tecido Conjuntivo			
	SÓLEO		EDL	
	Média	D.P	Média	D.P
GCI	1,2 ^a	0,7	1,5 ^A	0,6
GCF	1,8 ^{ab}	0,5	2,1 ^{AB}	0,5
GESP	3,7 ^c	1,1	3,5 ^C	1,1
GECP	2,4 ^b	0,7	2,4 ^{AB}	0,5

a,b,c,d – Letras minúsculas indica comparação da percentagem de tecido conjuntivo entre os grupos no músculo sóleo.

A,B,C,D - Letras maiúsculas indica comparação da percentagem de tecido conjuntivo entre os grupos no músculo EDL.

Letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Observando-se os dados da tabela 5 nota-se:

a-) uma semelhança na percentagem da área do tecido conjuntivo entre os músculos sóleo e EDL nos grupos estudados;

b-) que o grupo experimental que mais se aproximou dos grupos controle (GCI e GCF) foi o GECP.

Letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Figura 35 - Representação gráfica da média da percentagem de tecido conjuntivo do músculo sóleo e EDL.

5.3 Localização dos fatores de regulação miogênica MyoD e Miogenina por imunofluorescência.

As reações de imunofluorescência para localização espacial da MyoD e Miogenina nos músculos sóleo e EDL foram observadas em microscópio confocal para a visualização da expressão nos núcleos das fibras musculares. Foi possível observar a expressão de MyoD e Miogenina nos animais de todos os grupos estudados, exceto no GCD, pois os núcleos se encontravam desorganizadas e de difícil caracterização da expressão.

Nas figuras 36 e 37 observa-se a identificação das expressões da MyoD e Miogenina.

Figura 36 - Fotomicrografia mostrando a localização de MyoD e núcleos (seta). A, B e C, expressão de MyoD no músculo EDL. D, E e F, expressão de MyoD no músculo Sóleo. Uma dupla marcação foi realizada para observar a localização de MyoD (10 B,E) e núcleo (10 A,D) e as duas imagens sobrepostas mostrando a localização de MyoD e núcleo (10 C,F).

Figura 37 - Fotomicrografia mostrando a localização de Miogenina e núcleos (seta). A, B e C, expressão de Miogenina no músculo EDL. D, E e F, expressão de Miogenina no músculo sóleo. Uma dupla marcação foi realizada para observar a localização da Miogenina (10 B,E) e núcleo (10 A,D) e as duas imagens sobrepostas mostrando a localização de Miogenina e núcleo (10C,F).

5.4 Localização dos fatores de regulação miogênica MyoD e Miogenina por imunohistoquímica.

Os resultados das reações de imunohistoquímica para a imunomarcação de núcleos expressando MyoD e Miogenina estão nas figuras 38 e 39.

Figura 38 - Fotomicrografia mostrando a localização de núcleos expressando MyoD. A e B) Músculo Sóleo; C e D) Músculo EDL (Aumento 1000x).

Figura 39 - Fotomicrografia mostrando a localização de núcleos expressando Miogenina. A e B) Músculo Sóleo; C e D) Músculo EDL (Aumento 1000x).

Tabela 6 - Percentagem de núcleos expressando MyoD nos músculos Sóleo e EDL.

GRUPOS	MyoD			
	SÓLEO		EDL	
	Média	D.P	Média	D.P
GCI	10,6 ^a	0,8	10,3 ^A	0,2
GCF	6,6 ^b	0,2	7,5 ^B	0,4
GESP	12,9 ^c	0,7	13,3 ^C	0,5
GECP	16,4 ^d	0,6	15,2 ^D	0,2

Letras minúsculas indica comparação de myoD entre os grupos no músculo sóleo.

Letras maiúsculas indica comparação de myoD entre os grupos no músculo EDL.

Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si.

Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si.

Figura 40 - Representação gráfica da percentagem de núcleos expressando myoD no músculo sóleo e EDL.

Observando-se os dados da tabela 6 e da figura 34 nota-se que a percentagem de núcleos expressando a MyoD tanto no músculo sóleo como no EDL pode ser representado por : GECP>GESP>GCI>GCF.

Tabela 7 - Percentagem de núcleos expressando Miogenina nos músculos Sóleo e EDL.

GRUPOS	Miogenina			
	SÓLEO		EDL	
	Média	D.P	Média	D.P
GCI	9,8 ^a	0,5	11,6 ^A	0,5
GCF	7,9 ^b	0,3	7,5 ^B	0,5
GESP	15,9 ^c	0,7	17 ^C	0,3
GECP	15,3 ^c	0,4	15,7 ^C	0,4

Letras minúsculas indica comparação de miogenina entre os grupos no músculo sóleo.

Letras maiúsculas indica comparação de miogenina entre os grupos no músculo EDL.

Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si.

Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si.

Figura 41 - Representação gráfica da percentagem de núcleos expressando miogenina no músculo sóleo e EDL.

Observando-se os dados da tabela 7 e da figura 41 nota-se a percentagem de núcleos expressando miogenina tanto no músculo sóleo como no EDL pode ser representado da seguinte maneira: GESP=GECP>GCI>GCF.

5.5 Análise funcional da marcha.

Lembrando que, os valores próximos a -100 (cem) se referem à secção do nervo isquiático, e valores próximos a 0 (zero) se referem a animais do grupo controle, como já descrito anteriormente. Os dados sobre a análise funcional da marcha encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 - Análise funcional da marcha, utilizando a equação de BAIN et al.,(1989), postas em ordem decrescente.

Grupos	Valores das marchas	
	Média	D.P
GCI	-37 ^a	13,64
GCF	-0,8 ^b	25,40
GCD	-80 ^c	20,41
GESP	-63 ^{dac}	31,21
GECP	-75 ^{cd}	10,95

Letras iguais não apresentam diferença significativa estatisticamente.

Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si.

Figura 42 - Representação gráfica da análise funcional da marcha pelo índice funcional do isquiático.

Observando-se os dados da análise funcional da marcha na tabela 8 e figura 42 nota-se que não houve diferença entre os animais dos grupos experimentais (GESP e GECP) e que ambos estavam mais próximos aos animais do GCD do que dos animais dos outros grupos.

5.6 Peso dos animais

Os pesos médios, inicial e final, e ganho de peso em percentagem, dos animais de todos os grupos estudados, estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - 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 de massa (%)
GCI	268,2	---	---
GCF	266,3	489,3	83,7
GCD	276,7	478,8	73
GESP	273,5	426,2	55,8
GECP	258,5	437,9	69,4

Com a média por percentagem do ganho de peso dos animais pode-se dizer que, os animais de todos os grupos tiveram ganho de peso.

5.7 Observações Macroscópicas

Dois animais, um do GCD e outro do GECP realizaram autofagia no membro pélvico direito após 4 semanas pós-operatórias (Fig. 43A)

Figura 43 - Membro em que foi submetido à cirurgia, relatando autofagia de seu membro pélvico direito. Em (A) membro pélvico do animal do grupo GCD, (B) paralisia da pata do animal do grupo GECP.

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 região dorsal do membro pélvico, local onde foi realizado lesão do nervo isquiático.

Em todos os animais dos grupos experimentais (GESP e GECP) e os do GCD notou-se uma paralisia e parestesia da pata do lado onde o nervo isquiático foi seccionado, com imagem semelhante à chamada “*Waiters tip hand*”, a mão de garçom (Fig.43B), como nas lesões altas do plexo braquial (C5; C6).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A escolha da espécie animal rato (*Rattus norvegicus*) da linhagem wistar nesta pesquisa se deu por vários motivos como: por ser a espécie mais utilizada na literatura e por conseguir, com um número mínimo de animais, obtenção de resultados confiáveis (PEREIRA; SILVA; ROMEIRO, 1998), por ser um animal de fácil manipulação e de baixo custo, além de apresentar as características morfológicas do nervo periférico semelhante à dos nervos humanos (ELLIS; MCCAFFREY, 1984; VITTERBO et al., 1994; ROMÃO, 2011) e por tem sido frequentemente utilizado como modelo nos estudos para lesão nervosa periférica e na regeneração nervosa (DING et al., 2011; LIAO et al., 2011; MEDALHA et al., 2011).

O gênero masculino foi o escolhido, porque ratos do gênero feminino não são muito utilizados em estudos de regeneração nervosa (LINCOLN; SHORT, 1980; SULLIVAN; DAVISON, 2001), pois são mais suscetíveis à ação dos hormônios adenohipofisários e gonadais, o que poderia interferir na regeneração nervosa e com isso colocar em dúvida algumas variáveis (FRAHER et al., 1990). Entretanto estudos recentes têm demonstrado que os hormônios sexuais feminino causam efeitos neurotróficos no sistema nervoso periférico (KOVACIC; SKETELJ; BAJROVIĆ, 2003).

A via de administração de anestésico foi intramuscular, e as drogas utilizadas foram uma combinação de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilasina, pois é uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte (SCHANAIDER; SILVA, 2004; BONETTI, 2009).

O nervo isquiático foi escolhido por ser de fácil acesso, calibroso e semelhante ao nervo periférico humano (PACHIONI et al., 2006), por isso tem sido amplamente utilizado nas pesquisas com regeneração nervosa (MARCOL et al., 2011; PETTERSON et al., 2011).

Um dos problemas das lesões nervosas é a neurotmeose com perda de material nervoso, deixando um “gap” entre os seus cotos proximal e distal. O modelo experimental usado neste experimento teve como objetivo solucionar este tipo de problema, complementando estudos anteriores (KOSTOPOULOS et al., 2010; HSU,

2011; PETTERSON et al., 2011), e ainda permanece como um desafio para os cirurgiões.

No tratamento de lesões nervosas com perda de tecido nervoso há a necessidade, em alguns casos, de ser retirado um enxerto autógeno de nervo de outras partes do corpo, mas o uso deste tipo de técnica apresenta suas desvantagens e limitações, como a formação de neuroma (MARTINS; SIQUEIRA; TEDESCO-MARCHESE, 2002), déficit sensorial do local doador (FAWCETT; KEYNES, 1986), limitada disponibilidade do material doador (SINIS et al., 2006) e tamanho e calibre do enxerto (FREITAS; FLORES, 2007). Entretanto na tentativa de evitar danos secundários devido à retirada do enxerto autógeno de nervo, pesquisadores utilizam uma outra técnica de reconstrução nervosa, onde um tubo guia é utilizado para preencher a lacuna do nervo. A tubulização é uma técnica microcirúrgica, e para se obter resultados mais confiáveis, o procedimento cirúrgico nesta pesquisa foi realizado com o auxílio de microscópio cirúrgico, haja vista que propicia maior precisão (BARCELOS et al., 2003; MARTINS et al., 2005b; KOTULSKA et al., 2006; ATKINS et al., 2007).

Diversos materiais são utilizados nos condutos para as técnicas de tubulização como o colágeno (KEMP et al., 2009; TARAS; JACOBY; LINCOSKI, 2011), fibrina (KALBERMATTEN et al., 2009), quitosana (SIMÕES et al., 2010), ácido poli-láctico (LIU et al., 2011b), ácido poli-glicólico (SASAKI et al., 2011) e silicone (MOORE et al., 2011). Dentre os condutos mais pesquisados, encontram-se os tubos de polietileno (LANGONE; DA-SILVA, 1990; BRYAN; WANG; SUMMERHAYES, 1999; GAMA, 2000), e nesta pesquisa o diferencial foi à utilização do tubo de polietileno com poros em sua parede, com o intuito de possibilitar uma maior microvascularização no local enxertado, já que o nervo isquiático é ricamente vascularizado, e possui vasos intraneurais (IJKEMA-PAASSEN et al., 2005), o que possibilitaria acelerar o processo de regeneração nervosa. Este modelo experimental com polietileno poroso não foi encontrado em literatura para regeneração nervosa, sendo utilizado apenas na reconstrução de traumas no assoalho orbital (YILMAZ et al., 2007; KIM et al., 2011b).

Santiago et al. (2009) afirmam que somente o tubo como forma de orientação axonal não é suficiente para a regeneração nervosa por longos períodos, com isso, pesquisadores incorporam fatores ou células neurotróficas dentro do tubo. Em nosso experimento foi utilizado o tecido adiposo como forma de preenchimento,

visando promover um fator de crescimento neural, já que o mesmo se encontra adjacente a um feixe vâsculo-nervoso, portanto em contato íntimo com o epineuro dos nervos periféricos (MORAES, 2009; ROSA-JUNIOR, 2010). Várias pesquisas recentes afirmam que o tecido adiposo também é responsável pela produção da neurotrofina, um dos fatores de crescimento neural, o que auxiliaria na regeneração nervosa (CHALDAKOV et al., 2004; SORNELLI et al., 2007; RYAN et al., 2008; LIU et al., 2011a).

Castañeda e Kinne (2002) utilizaram um enxerto preparado a partir do omento maior, rico em tecido adiposo, para reparar o nervo isquiático de ratos e observaram uma recuperação funcional significativa. Em nosso experimento o tecido adiposo foi coletado na mesma região da lesão, a fim de evitar uma segunda intervenção cirúrgica, reduzindo o risco de infecções.

O tamanho da lesão nervosa a ser estudado é outro fator desafiador, em nossa pesquisa foi retirado um segmento nervoso de 10 mm, já que esta lacuna é amplamente utilizada nas pesquisas com regeneração nervosa (ZHANG et al., 2008; KALBERMATTEN et al., 2009; KEMP et al., 2009; LI et al., 2010; LIU et al., 2011b; WEI et al., 2011), porém os tamanhos das lesões nervosas são muito variáveis e chegam até a 40mm (SINIS et al., 2006; KOSTOPOULOS et al., 2010).

O sacrifício dos animais aconteceu 150 dias pós-operatório, pois dados na literatura demonstram que neste período acontece a maior resposta funcional e morfológica da lesão nervosa (WOLTHERS et al., 2005).

Nesta pesquisa, os dados obtidos com a morfometria das fibras dos músculos sóleo e EDL, por meio da HE, mostram que, tanto a tubulização como o preenchimento com tecido adiposo, produziram um aumento nas suas áreas quando comparadas com as do GCI. Com relação ao preenchimento da tubulização a literatura mostra dados semelhantes em estudo com o EDL (MORAES, 2009).

Ijkema-Paassen, Meek e Gramsbergen (2005) encontraram que a área transversal do músculo sóleo reinervado, por um período de 21 semanas, era de aproximadamente 50% menor do que nos animais do controle. Os resultados obtidos com o músculo sóleo nesta pesquisa foram melhores do que os citados no trabalho anterior porque nos animais do GESP a área das fibras foi 45% menor do que nos animais do GCF e nos animais do GECP os valores foram 40% menor do que nos animais do GCF.

A morfometria não foi realizada nos animais desnervados nesta pesquisa, pois as fibras se encontravam de maneira desorganizada, observações semelhantes ao descrito em literatura, onde relatam que a lesão nervosa por longo período, promove alterações no músculo desnervado, como aumento de tecido adiposo (RODRIGUES et al., 2007), aumento de tecido conjuntivo (SCHMALBRUCH; LEWIS, 2000) e diminuição da área da fibra (JACKMAN; KANDARIAN, 2004).

Os dados desta pesquisa mostram uma atrofia das fibras musculares maior no músculo sóleo (GESP = 45% e GECP = 38%) do que no músculo EDL (GESP = 40% e GECP = 28%). Tal fato pode ser explicado porque após desnervação do membro posterior de ratos, o músculo EDL sofre um alongamento passivo, ocasionado pelo fato das patas posteriores ficarem em posição plantar (WASHABAUGH et al., 2001), e isto diminui a atrofia muscular (GOLDSPINK, 1978).

Os grupos reinervados desta pesquisa tiveram menor atrofia muscular no músculo EDL do que o Sóleo. Isso pode ser explicado por (BODINE-FOWLER et al., 1997) na qual explica que apenas 14% dos axônios do sóleo conseguem encontrar seu alvo correto após reparo do nervo, o que indica que a maioria dos axônios reinervados vem de diferentes grupos de neurônios.

A organização histoquímica de um músculo é sensível após uma lesão nervosa, e é uma importante ferramenta para o estudo da regeneração nervosa (KARPATI; ENGEL, 1967; CONSTANTINIDIS, 2001).

Nos animais controle desta pesquisa o músculo sóleo apresentou predominância de fibras de contração lenta (70 e 75% de fibras do tipo SO), o que corrobora com o descrito em literatura (JAWEED; HERBISON; DITUNNO, 1975; ZHON et al., 2005; DIMOV; DIMOV, 2007). O músculo EDL apresentou predominância de fibras do tipo rápidas (95% de fibras do tipo FG e FOG) que está de acordo com Lehnert et al. (2003).

Com relação à modulação dos tipos de fibras produzidos pela reinervação, nesse experimento observou-se uma maior redução na área das fibras do tipo SO nos animais do GESP, resultado semelhantes ao apresentado por Durigan et al. (2006) onde observou uma vulnerabilidade maior à atrofia das fibras musculares lentas do que as rápidas.

Com relação aos diferentes tipos de fibras, o músculo sóleo, que é composto predominantemente por fibras de contração lenta, apresentou um aumento nas fibras de contração rápida (FG e FOG) e diminuição das fibras de

contração lenta (SO), ocasionada pela reinervação utilizada nesta pesquisa, que induziu modulações no seu perfil fenotípico. Resultados semelhantes a este já tinham sido observados em estudos anteriores sobre reinervação de músculos (GILLESPIE; GORDON; MURPHY, 1987; DAEMEN et al., 1998; IJKEMA-PAASSEN; MEEK; GRAMSBERGEN, 2001, 2005), e em indivíduos imobilizados (LIEBER, 2002).

Rafuse e Gordon (1998) e Lehnert et al. (2003) relatam que no músculo EDL após uma reinervação ocorre um aumento das fibras de contração rápida (FG e FOG), o que corrobora com esta pesquisa.

Este achado sugere que o padrão rápido de reinervação desempenha um papel dominante na especificação do fenótipo das fibras durante a regeneração, o que também pode comprometer a recuperação funcional de longa duração do músculo reinervado (MENDLER et al., 2008).

Diferentes fatores podem afetar os tipos de fibra dos músculos em regeneração. Uma possibilidade é que as fibras musculares são envoltas por uma matriz extracelular diferente, o que afetaria a expressão de genes diferentes, o outro é que as células satélites dos músculos são diferentes e afetaria os diferentes tipos de fibras durante a regeneração, já que as fibras musculares se regeneram após uma lesão nervosa ativando a célula satélite (KALHOVDE et al., 2005).

Nas amostras musculares em ambos os músculos desta pesquisa, foi encontrado um agrupamento de fibras com o mesmo perfil metabólico, denominado “type grouping” e é um achado frequente em músculos reinervados (KARPATI; ENGEL, 1968; BERTELLI et al., 1996). Bovenberg et al. (2011) dizem que este agrupamento com o mesmo perfil metabólico está relacionado a desorientação dos axônios motores em regenerar o músculo alvo, e isto muda o padrão das fibras musculares de contração lenta e rápida no músculo alvo. Fibras com o mesmo perfil metabólico foram encontradas em ambos os músculos, mas com maior predominância no músculo sóleo.

Em nossa pesquisa foi observado um predomínio no agrupamento de fibras do tipo SO, resultado semelhante foi observado por Karpati e Engel (1968) e Larkin, Kuzon e Halter (2003). Dados que podem ser explicado por Burke et al. (1974) e por Rivero, Talmádge e Edgerton (1999), que afirmam que as fibras lentas tem uma ativação ou recrutamento anterior ao das fibras rápidas.

Vleggart-lankamp et al. (2005) descreveram que a arquitetura das unidades motoras nos músculos é fundamental para a sua função, e o type grouping é uma estratégia utilizadas para garantir o sucesso da regeneração do nervo periférico.

De acordo com a literatura a atrofia muscular pós desnervação ocasiona um aumento de tecido conjuntivo (SALONEN et al., 1985; POLACOW et al., 2003), o que pode contribuir para a diminuição na circulação sanguínea do músculo (JÄRVINEN, 1977), e interferir na recuperação funcional após a reinervação (CARTER et al., 1998). Com relação à área de tecido conjuntivo intramuscular de músculos normais, a literatura apresenta valores de 1% a 10% (NICKS et al., 1989; DELP; DUAN, 1996). Neste estudo observou-se valores próximos a 2% tanto no sóleo quanto no EDL, valores que condizem com o descrito em literatura.

Estudos mostram que a quantidade de tecido conjuntivo pode aumentar nos músculos estriados quando estes são imobilizados (JÄRVINEN et al., 2002; PAIXÃO, 2011), desnervados (LU; HUANG; CARLSON, 1997; ARRUDA et al., 2007) ou reinervados (CARTER et al., 1998). A literatura mostra que durante a reinervação, o tecido conjuntivo forma uma barreira afetando o crescimento axonal (LU; HUANG; CARLSON, 1997). Neste trabalho a quantidade de tecido conjuntivo encontrada nos grupos experimentais está semelhante aos valores dos músculos normais (GESP = 3,7% e GECP = 2,4%), o que demonstra uma boa regeneração muscular. Tal fato pode ser explicado porque os tubos usados na reinervação proporcionam uma orientação dos axônios, prevenindo o seu escape dos brotos nervosos para os tecidos, e com isso reduzem a invasão de tecido conjuntivo (DELISTOIANOV et al., 2008).

Em circunstâncias normais, as células satélites dos músculos permanecem em repouso, mas quando estes são danificados por algum motivo, como por exemplo, na desnervação, elas são induzidas a se diferenciarem e finalmente formar uma nova fibra muscular (MEGENEY et al., 1996; ADAMS, 2006).

A ativação e o controle da diferenciação das células satélites são expressas por fatores regulatórios miogênicos (MRFs), como a myoD e a miogenina (ISHIDO; KAMI; MASUHARA, 2004).

As alterações na expressão dos MRFs estão diretamente envolvidas no controle fenotípico muscular e nas alterações metabólicas, em resposta a várias condições como alterações hormonais (HUGHES et al., 1993), exercício físico

(HUGHES et al., 1999), desnervação (LAPALOMBELLA, 2008; CHEN, 2010) e reinervação (ZHOU et al., 2006). Fato interessante foi relatado por Bertagli (2001) em estudos com os músculos sóleo e EDL de ratos com insuficiência cardíaca, onde demonstrou-se que a regulação da expressão de MyoD ocorreu apenas no músculo EDL, diferente aos dados encontrados nesta pesquisa.

A expressão de miogenina aumenta tanto na desnervação como na reinervação de um músculo. Na desnervação em músculos de ratos, a expressão da miogenina aumenta significativamente durante um curto período inicial (WRIGHT; SASSOON; LIN, 1989). Em humanos, miogenina atingiu valores de 37 vezes maiores que o normal após 7 meses de desnervação, diminuindo para 21 e para 11 vezes em 12 e 26 meses pós desnervação, respectivamente. Na reinervação a miogenina é expressa em níveis mais elevados durante os últimos estágios de diferenciação de mioblastos e durante a formação do miotubo (KOSTROMINOVA et al., 2000; CHEN, 2011) sugerindo que a expressão de miogenina ocorre em uma fase mais tardia que a myoD (ISHIDO; KAMI; MASUHARA, 2004). Tal fato não pode ser observado nesta pesquisa porque os animais foram sacrificados em um único período.

A myoD está presente nos estágios iniciais de desenvolvimento, onde interage para iniciar a expressão gênica da célula muscular (MOLKETIN et al., 1995). Em nossa pesquisa a myoD tanto no sóleo quanto no EDL apresentou maiores expressões nos animais reinervados em relação ao controle. Isso pode ser explicado por Jin et al. (2000) que diz que a MyoD está envolvida na fase inicial de diferenciação, portanto estando pouco expressa em músculos já diferenciados.

Chen et al. (2010) identificaram um aumento na expressão de myoD nos músculos desnervados e nos músculos reinervados, sugerindo que ocorre a reativação das células satélites para a regeneração muscular.

Neste estudo observou-se um aumento na quantidade dos MRFs nos animais dos dois grupos experimentais (GESP e GECP). Tal fato está de acordo com as informações da literatura que afirmam que a reinervação pode induzir a ativação de células satélites e que a expressão aumentada de myoD é um indicador da proliferação destas células (HUGHES et al., 1997; SEWARD et al., 2001; DASARATHY et al., 2007) e que a reinervação pela técnica de tubulização promove uma alteração na modulação nos fatores de regulação miogênica (RAMOS-JUNIOR, 2009). Portanto os níveis mais altos de expressão de MyoD e miogenina em

músculos desnervados e reinervados, pode representar melhor potencial regenerativo (CHEN et al., 2009; CHEN et al., 2010).

Os MRFs têm função primária na miogênese e estão envolvidas também na manutenção do fenótipo da fibra muscular adulta, pois vários estudos têm sugerido que a MyoD é expressa em níveis superiores em músculos glicolíticos/rápidos, enquanto a miogenina é encontrada principalmente em músculos oxidativos/lentos (HUGHES et al., 1993; MEGENEY; RUDNICKI, 1995), o que sugere que existem diferenças intrínsecas entre as células satélites do sóleo e EDL (LAGORD et al., 1998; RAMOS-JUNIOR, 2009). O fenômeno descrito anteriormente não ocorreu com os animais dos grupos experimentais (GESP e GECP) desta pesquisa. Tal resultado poderia ser explicado pelo fato de que a reinervação desempenha um papel importante na especificação do fenótipo das fibras musculares durante a regeneração e que as fibras de contração rápida apresentam melhor recuperação do que as de contração lenta em músculos reinervados (WALTERS; STICKLAND; LOUGHNA, 2000; MENDLER et al., 2008), inicialmente aumentando as fibras de contração lentas híbridas, antes de se transformarem em fibras de contração rápida (OHIRA et al., 2006; PATTERSON; STEPHENSON; STEPHENSON, 2006). Deve ser lembrado também, que um músculo de contração rápida desnervado, como por exemplo o EDL, induz a conversão de fibras de contração rápida para contração lenta (WALTERS; STICKLAND; LOUGHNA, 2000).

Em relação à análise funcional da marcha, verificou-se que nos animais dos grupos experimentais (GESP e GECP) não obtiveram boa recuperação funcional, quando comparado ao normal. Dados semelhantes foram encontrados por Moraes (2009) e Rosa-Junior (2010) que observaram que a tubulização com enxerto de veia com e sem preenchimento de tecido adiposo não apresentou recuperação funcional adequada quando comparado ao normal. Isso pode ser explicado por Ma et al. (2011) que observaram que após uma transecção do nervo isquiático a recuperação funcional pode ser lenta, devido ao atraso dos axônios motores em alcançar seu alvo, resultando em uma falta de reinervação na placa motora e consequente demora na recuperação funcional. Isso foi comprovado por Hsu et al. (2011) que utilizaram um tubo de ácido polilático microporoso como enxerto, e observaram que a reinervação ocorreu em torno de 4 meses, porém a recuperação funcional só aconteceu por volta de 18 meses.

Os resultados dos experimentos usando lesões de nervos periféricos (esmagamento ou transecção) em ratos são prejudicados pela tendência dos animais em atacar o membro lesado, denominados autotomia ou autofagia (SPOREL-OZAKAT et al., 1991). A autofagia pode ser atribuída à falta de sensibilidade no membro causado pela lesão nervosa (BARCELOS et al., 2003), fato observado em dois animais neste estudo.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Baseado nos dados encontrados nesta pesquisa conclui-se que:

a-) o uso apenas do tubo de polietileno poroso e preenchido com tecido adiposo influenciaram de maneira positiva na reinervação de músculos de contração lenta e rápida, de ratos, produzindo alterações morfológicas mais próximas aos animais dos grupos controles do que aos dos animais do GCD;

b-) na maioria das técnicas de avaliação usadas, para ambos os músculos, mostraram resultados morfológicos que mais se aproximaram aos dos animais dos grupos controles foi a da tubulização com preenchimento de tecido adiposo;

c-) o uso apenas do tubo de polietileno poroso e preenchido com tecido adiposo mostraram resultados tendendo a aproximar mais dos animais dos grupos controles do que os animais GCD.

Referências

REFERÊNCIAS

ADAMS, A.M.; ARRUDA, E.M.; LARKIN LM. Use of adipose-derived stem cells to fabricate scaffold less tissue-engineered neural conduits in vitro. *Neuroscience*, [Epub ahead of print], 2011.

ADAMS, G.R. Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 31, n. 6, p. 782-790, 2006.

AEBISCHER, P.; SALESIOTIS, A.N.; WINN, S.R. Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates peripheral nerve regeneration across long nerve gaps. **J Neurosci Res**, v.23, p.282-289, 1989.

AGUIAR, A.F. **Vias moleculares envolvidas no controle da hipertrofia muscular**. Trabalho apresentado no VII Workshop da Pós-graduação da Unesp, Botucatu. 2008.

ALFREDO, P.P. et al. Effects of phonophoresis with Arnica Montana onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: an experimental study. **Ultrasonics**, v. 49, n. 4-5, p. 466-471, 2009.

ANZIL, A.P.; WERNIG, A. Muscle fiber loss and reinnervation after long-term denervation. **J Neurocytol**, v. 18, n. 6, p. 833–845, 1989.

ARNOLD, H.H.; BRAUN, T. Genetics of muscle determination and development. **Curr Top Dev Biol**, v. 48, p. 129-164, 2000.

ARRUDA, E.M. et al. Denervation does not change the ratio of collagen I and collagen III mRNA in the extracellular matrix of muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, p. 983–987, 2007.

ATKINS, S. et al. Interleukin-10 reduces scarring and enhances regeneration at a site of sciatic nerve repair. **J Peripher Nerv Syst**, v. 12, n. 4, p. 269-276, 2007.

BAIN, J.R. et al. Improved functional recovery of denervated skeletal muscle after temporary sensory nerve innervation. **Neuroscience**, v. 103, n. 2, p. 503-510, 2001.

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Surg Reconstr**, v. 83, n. 1, p. 129–138, 1989.

BARCELOS, A.S. et al. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. **Microsurgery**, v. 23, n. 1, p. 66-71, 2003.

BARTH, W. L. **Células tronco e bioética**: o progresso biomédico e os desafios éticos. Porto Alegre: Edipucrs, 2006.

BERTAGLIA, R. S. **Avaliação bioquímica, morfológica e funcional do músculo estriado esquelético de ratos na insuficiência cardíaca**. Dissertação (Mestrado em biologia geral e aplicada) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337-348, 2011.

BODINE-FOWLER, S. et al. Inaccurate projection of rat soleus motoneurons: a comparison of nerve repair techniques. **Muscle Nerve**, v. 20, n. 1, p. 29-37, 1997.

BOFF, S.R. A fibra muscular e fatores que interferem no seu fenótipo. **Acta Fisiatr**, v.15, n.2, p. 111 – 116, 2008.

BONETTI, L.V. **Análise morfofuncional do músculo sóleo e do nervo ciático de ratos submetidos ao treinamento de equilíbrio e coordenação após lesão por esmagamento do nervo ciático**. Dissertação (Mestrado em neurociência) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

BOVENBERG, M. S. et al. Type grouping in rat skeletal muscle after crush injury. **J Neurosurg**, v. 114, n. 5, p. 1449–1456, 2011.

BOWDEN, R. E. M.; GUTMANN, E. Denervation and re-innervation of human voluntary muscle. **Brain**, v. 67, n. 4, p. 273-313, 1944.

BRAYN, D.J.; WANG, K.K.; SUMMERHAYES, G. Migration of Schwann cells in peripheral nerve regeneration. **J Reconstr Microsurg**, v. 15, n. 8, p. 591-596, 1999.

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

BURKE, R.E. et al. Motor units in cat soleus muscle: physiological, histochemical and morphological characteristics. **J Physiol**, v. 238, n. 3, p. 503-514, 1974.

BURNETT, M.G.; ZAGER, E.L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurg Focus**, v. 16, n. 5, p. 1-7, 2004.

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

CARLSON, B.M.; FAULKNER, J.A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. **Med Sci Sports Exer**, v. 15, n. 3, p. 187-198, 1983.

CARTER, A.J. et al. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. **J Hand Surg**, v. 23, n. 3, p. 265-269, 1998.

CASTAÑEDA, F.; KINNE, R.K. Omental graft improves functional recovery of transected peripheral nerve. **Muscle Nerve**, v. 26, n. 4, p. 527-532, 2002.

CHALDAKOV, G. N. et al. Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: a role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? **Prog Brain Res**, v. 146, p. 279-289, 2004.

CHAMBERLAIN, L. J. et al. Near-terminus axonal structure and function following rat sciatic nerve regeneration through a collagen-GAG matrix in a ten-millimeter gap. **J Neurosci Res**, v. 60, n. 5, p. 666-677, 2000.

CHARGÉ, S.B.P.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev**, v. 84, p. 209-238, 2004.

CHEN, D. et al. The influence of delayed innervation on the facial muscles of denervated rats. **J Audiol Speech Pathol**, v. 17, p. 470-473, 2009.

CHEN, D. et al. Modulation of satellite cells in rat facial muscle following denervation and delayed reinnervation. **Acta Otolaryngol**, v. 130, n.12, p. 1411-1420, 2010.

CHEN, L. et al. The study of myogenin expression in denervated human skeletal muscles. **J Int Med Res**, v. 39, n. 2, p. 378 – 387, 2011.

COLOMÉ, L.M. et al. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Cienc Rural**, v.38, n.9, p. 2529-2534, dez, 2008.

CONSTANTINIDIS, J. et al. Morphological changes of denervated and reinnervated rat facial muscle. **Acta Otolaryngol**, v. 121, n. 6, p. 763–767, 2001.

CORNACHIONE, A.S. et al. Characterization of fiber types in different muscles of the hind limb in female weanling and adult wistar rats. **Acta Histochem Cytochem**, v. 44, n. 2, p. 43-50, 2011.

COSTA, J.; CAMARGO, V. M.; ANDRE, E. S. Proposta de um método de baixo custo para avaliação da marcha em ratos. **Rev Fisioter Mov**, v. 21, n. 2, p. 115-123, 2008.

DAEMEN, M.A. et al. Motor denervation induces altered muscle fiber type densities and atrophy in a rat model of neuropathic pain. **Neurosci Lett**, v. 247, n. 2-3, p. 204-208, 1998.

DANGELO, J.G., FATTINI, C.A. Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

DANIELSEN, N. Fibroblast growth effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. **J Neurosci Res**, v. 20, p. 320, 1988.

DASARATHY, S. et al. Altered expression of genes regulating skeletal muscle mass in the portcaval anastomosis rat. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 292, p. 1105-1113, 2007.

DE SÁ, M. et al. The end to side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. **J Neurosci Methods**, Oxford, v. 136, n. 1, p. 45-53, 2004.

DEDKOV, E.I. et al. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. **Anat Rec**, v. 263, n.2, p. 139-154, 2001.

DELISTOIANOV, N. et al. Implant of silicone tube with or without collagen in nerve regeneration of horses. **Cienc Rural**, v.38 n.6, 2008.

DELP, M.D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity if rat muscle. **J Appl Physiol**, v. 80, n. 1, p. 261-270, 1996.

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**, v. 77, p. 634-643, 1982.

DE MORAES, A.C.; BANKOFF, A.D. Electromyography response of the iliocostalis lumborum muscle during flexion, extension and rotation movements of the trunk in orthostatic and seated position. **Electromyogr Clin Neurophysiol**, v. 43, n. 4, p. 241-249, 2003.

DESOUCHES, C. et al. La réparation nerveuse périphérique: 30 siècles de recherche. **Rev Neurol**, v. 161, p. 1045-1059, 2005.

DIMOV, D.T.; DIMOV, I. Muscle fiber types and fiber morphometry in the soleus muscle of the rat. **Medicine and Biology**, v.14, n.3, 121-127, 2007.

DING, T. et al. Rapid repair of rat sciatic nerve injury using a nanosilver-embedded collagen scaffold coated with laminin and fibronectin. **Regen Med**, v. 6, n. 4, p. 437-447, 2011.

DORNSEIFER, U. et al. Peripheral nerve reconstruction with collagen tubes filled with denatured autologous muscle tissue in the rat model. **Microsurgery**, v. 31, n. 8, p. 632-641, 2011.

DU, F. et al. A hind limb disuse model inducing extensor digitorum longus atrophy in rats: tail suspension-immobilization. **Aviat Space Environ Med**, v. 82, n. 7, p. 689-693, 2011.

DUBOWITZ, V.; NEERUNJUN, J. Muscle transplantation in normal and dystrophic animals. **J Physiol**, v. 231, n. 2, p.61, 1973.

DUBOWITZ, V.; PEARSE, A. G. A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. **Histochem cell biol**, v. 2, n. 2, p. 105-117, 1960.

DURIGAN, J.L.Q. et al. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização aguda associado à estimulação elétrica neuromuscular. **Rev Fisioter Mov**, v.19, n.2, p. 117-126, 2006.

EBERSTEIN, A.; EBERSTEIN, S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? **Med Sci Sports Exerc**, v. 28, n. 12, p. 1463-1469, 1996.

ELLIOTT, A.; OFFER, G. Shape and flexibility of the myosin molecule. **J Mol Biol**, v. 123, p. 505-519, 1978.

ELLIS, J.C.; MCCAFFREY, T.V. Animal model for peripheral nerve grafting. **Otolaryngol. Head Neck Surg**, v. 92, n.5, p. 546-550, 1984.

EMERSON, C.P. Skeletal myogenesis: genetics and embryology to the fore. **Curr Opin Genet Dev**, v. 3, p. 265-274, 1993.

FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. **J Neurosurg**, v. 65, n. 3, p. 354-363, 1986.

FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. **Annu Rev Neurosci**, v. 13, p. 43-60, 1990.

FERRARI, F. et al. Inside-out vs standard vein graft to repair a sensory nerve in rats. **Anat Rec**, v. 256, p. 227-232, 1999.

FIELDS, R.D. et al. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Prog Neurobiol**, v. 33, n. 2, p. 87-137, 1989.

FLÜCK, M., HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 146, p. 159-216, 2003.

FOSCHINI, R. M. S. A.; RAMALHO, F. S.; BICAS, H. E. A. Células satélites musculares. **Arq Bras Oftalmol**, v. 67, n. 4, p. 681-687, 2004.

FRAHER, J.P. et al. Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. I. Normal animals. **Acta Neuropathol**, v. 79, p.364-374, 1990.

FRASER, J.K. Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 24, p. 150–154, 2006.

FREITAS, T.S.; FLORES, L.P. Uso da técnica de tubulização para o reparo de lesões do sistema nervoso periférico. **Arq Bras Neurocir**, v. 26, n. 1, p. 16-23, 2007.

GAMA, S.A.M. Estudo experimental comparativo da ação das neurocinas cardiotrofina-1 e oncostatina-M na regeneração nervosa periférica. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2000.

GILLESPIE, M.J.; GORDON, T.; MURPHY, P.R. Motor units and histochemistry in rat lateral gastrocnemius and soleus muscles: evidence for dissociation of physiological and histochemical properties after reinnervation. **J Neurophys**, v. 57, n. 4, p. 921-937, 1987.

GILLIES, A.R.; LIEBER, R.L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318-331, 2011.

GOLDSPINK, D.F. The effects of denervation on protein turnover of the soleus and extensor digitorum longus muscles of adult mice. **Comp Biochem Physiol**, v. 61, n. 1, p. 37–41, 1978.

GOLDSPINK, G. Gene expression in muscle in response to exercise. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 24, n. 2-3, p. 121-126, 2003.

GREGORY, C.M. et al. Metabolic and phenotypic characteristics of human skeletal muscle fibers as predictors of glycogen utilization during electrical stimulation. **Eur J Appl Physiol**, v. 95, n. 4, p. 276-282, 2005.

GUTMANN, E.; YOUNG, J. Z. The reinnervation of muscle after various periods of atrophy. **J Anat**, v. 78, p. 15-43, 1944.

HRUSKA, R. E.; KENNEDY, S.; SILBERGELD, E.K. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. **Life Sci**, v. 25, n. 2, p. 171–179, 1979.

HSU, S.H. et al. Peripheral nerve regeneration using a microporous polylactic acid asymmetric conduit in a rabbit long-gap sciatic nerve transection model. **Biomaterials**, v. 32, n. 15, p. 3764-3775, 2011.

HUGHES, S.M. et al. Selective accumulation of MyoD and Miogenin mRNAs in fast and slow muscle is controlled by innervation and hormones. **Development**, v. 118, p.1137-1147, 1993.

HUGHES, S.M. et al. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. **Mech Dev**, v. 61, p. 151-163, 1997.

HUGHES, S.M. et al. Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. **J Cell Biol**, v. 145, n. 3, p. 633-642, 1999.

HUPP, J.R. Neuropatologia Facial. In **Cirurgia Maxilofacial Contemporânea**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 678-691, 2000.

HURME, T.; KALIMO, H. Adhesion in skeletal muscle during regeneration. **Muscle Nerve**, v. 15, n. 4, p. 482-489, 1992.

HYATT, J.P.K. et al. Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 285, n. 5, p. 1161–1173, 2003.

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

IJKEMA-PAASSEN, J.; MEEK, M.F.; GRAMSBERGEN, A. Long-term reinnervation effects after sciatic nerve lesions in adult rats. **Ann Anat**, v. 187, n. 2, p. 113–120, 2005.

IJKEMA-PAASSEN, J.; MEEK, M.F.; GRAMSBERGEN, A. Muscle differentiation after sciatic nerve transection and reinnervation in adult rats. **Ann Anat**, v. 183, n. 4, p. 369–377, 2001.

ILHA, J. et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 22, n. 4, p. 355-366, 2008.

INADA, Y. et al. Regeneration of peripheral motor nerve gaps with a polyglycolic acid-collagen tube: technical case report. **Neurosurgery**, v. 61, n. 5, p. 1105-1107, 2007.

ISHIDO, M.; KAMI, K.; MASUHARA, M. Localization of myoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles. **Acta Physiol Scand**, v.180, n. 3, p. 281-289, 2004.

JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, n. 4, p. 834-843, 2004.

JÄRVINEN, M. Immobilization effect on the tensile properties of striated muscle: an experimental study in the rat. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 58, n. 3, p. 123-127, 1977.

JÄRVINEN, T.A. et al. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscle. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 23, n. 3, p. 245-254, 2002.

JÄRVINEN, T.A. et al. Muscle injuries: optimizing recovery. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 21, n. 2, p. 317-331, 2007.

JAWEED, M. M.; HERBISON, G. J.; DITUNNO, J. F. Denervation and reinnervation of fast and slow muscle. A histochemical study in rats. **J Histochem Cytochem**, v. 23, n. 11, p. 808-827, 1975.

JIN, Y. et al. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, mdx and dy, during regeneration. **Acta Neuropathol**, v. 99, n. 6, p. 619-627, 2000.

JOHSON, E.O.; ZOUBOS, A.B.; SOUCACOS, P.N. Regeneration and repair of peripheral nerves. **Injury**, v. 36, n. 4, p. 24-29, 2005.

JOLICOEUR, F. B. et al. Measurement of ataxia and related neurological signs in the laboratory rat. **Can J Neurol Sci**, v.6, n. 2, p. 209-215, 1979.

JÓZSA, L. et al. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. **J Bone Joint Surg**, v. 72, n. 2, p. 293-297, 1990.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.

KALBERMATTEN, D.F. et al. New fibrin conduit for peripheral nerve repair. **J Reconstr Microsurg**, v. 25, n. 1, p. 27-33, 2009.

KALHOVDE, J.M. et al. 'Fast' and 'slow' muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. **J Physiol**, v. 562, n. 3, p. 847–857, 2005.

KARAGOZ, H. et al. Comparison of regeneration results of prefabricated nerve graft, autogenous nerve graft, and vein graft in repair of nerve defects. **Microsurgery**, v. 29, n. 2, p. 138-143, 2009.

KARPATI, G.; ENGEL, W.K. Transformation of the histochemical profile of skeletal muscle by 'foreign' innervation. **Nature**, v. 215, p. 1509–1510, 1967.

KARPATI, G.; ENGEL, W.K. 'Type grouping' in skeletal muscles after experimental reinnervation. **Neurology**, v. 18, n. 5, p. 447–455, 1968.

KASPER, C.E.; TALBOT, L.A.; GAINES, J.M. Skeletal muscle damage and recovery. **AACN Clin Issues**, v. 13, n. 2, p. 237-247, 2002.

KEMP, S.W. et al. Collagen nerve conduits promote enhanced axonal regeneration, schwann cell association, and neovascularization compared to silicone conduits. **Tissue Eng Part A**, v. 15, n.8, p. 1975-1988, 2009.

KIM, J.H. et al. Myosin light chain 3f attenuates age induced decline in contractile velocity in MHC type II single muscle fibers. **Aging cell**, v. 21, 2011a.

KIM YH. et al. Inlay implanting technique for the correction of medial orbital wall fracture. **Plast Reconstr Surg**, v. 127, n. 1, p. 321-326, 2011b.

KINGHAM, P. J. et al. Reinnervation of laryngeal muscles: a study of changes in myosin heavy chain expression. **Muscle Nerve**, v. 32, p. 761–766, 2005.

KOKA, R.; HADLOCK, T. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transaction. **Neurol Exp**, v. 168, n. 1, p. 192-195, 2001.

KOSTOPOULOS, E. et al. Tubulization techniques in brachial plexus surgery in an animal model for long-nerve defects (40 mm): a pilot study. **Ann Plast Surg**, v. 64, n. 5, p. 614-621, 2010.

KOSTROMINOVA, T.Y. et al. Regulation of myogenin protein expression in denervated muscles from young and old rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 1, p. 179-188, 2000.

KOTULSKA, K. et al. Effect of oblique nerve grafting on peripheral nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v. 26, n. 8, p. 579-584, 2006.

KOVACIC, U.; SKETELJ, J.; BAJROVIĆ, F.F. Sex-related difference in collateral sprouting of nociceptive axons after peripheral nerve injury in the rat. **Exp Neurol**, v. 184, n. 1, p. 479-488, 2003.

KRUEGER-BECK, E. et al. Campos elétricos e magnéticos aplicados à regeneração nervosa periférica. **Rev Neurocienc**, v.19, n. 2, p. 314-328, 2011.

LAGORD, C. et al. Differential myogenicity of satellite cells isolated from extensor digitorum longus (EDL) and soleus rat muscles revealed in vitro. **Cell Tissue Res**, v. 291, n. 3, p. 455-468, 1998.

LANGONE, F.; DA-SILVA, C.F. Exogenous ganglioside stimulation of axonal regeneration after nerve transection and entubulation repair. **Braz J Med Biol Res**, v. 23, n. 9, p. 823-86, 1990.

LAPALOMBELLA, R. et al. Persistence of regenerative myogenesis in spite of down-regulation of activity-dependent genes in long-term denervated rat muscle. **Neurol Res**, v. 30, n. 2, p. 197-206, 2008.

LARKIN, L.M.; KUZON, W.M.; HALTER, J.B. Effects of age and nerve-repair grafts on reinnervation and fiber type distribution of rat medial gastrocnemius muscles. **Mech Ageing Dev**, v. 124, n. 5, p. 653-661, 2003.

LEE, S.K.; WOLFE, S.W. Peripheral nerve injury and repair. **Am Acad Ortho Surg**, v. 8, n. 4, p. 243-252, 2000.

LEHNERT, M. et al. Histochemical alterations of re-innervated rat extensor digitorum longus muscle after end-to-end or graft repair: a comparative histomorphological study. **J Anat**, v. 203, n. 1, p. 21-29, 2003.

LI, B.C. et al. PLGA conduit seeded with olfactory ensheathing cells for bridging sciatic nerve defect of rats. **J Biomed Mater Res A**, v. 94, n. 3, p. 769-780, 2010.

LI, S. et al. Identification and functional annotation of novel microRNAs in the proximal sciatic nerve after sciatic nerve transection. **Sci China Life Sci**, v. 54, n. 9, p. 806-812, 2011.

LIAO, C.D. et al. Peripheral nerve repair: monitoring by using gadofluorine m-enhanced MR imaging with chitosan nerve conduits with cultured mesenchymal stem cells in rat model of neurotmesis. **Radiology**, [Epub ahead of print] 2011.

LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure, function and plasticity**: the physiological basis of rehabilitation. 2 ed. San Diego: Lippincott Williams e Wilkins, 2002.

LINCOLN, G. A.; SHORT, R. V. Seasonal breeding nature's contraceptive. **Reprod. Prog. Horm. Res.**, New York, v.36, p. 1-52, 1980.

LIU, G. et al. Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair. **Int J Mol Med**, v. 28, n. 4, p. 565-672, 2011a.

LIU, J.J. et al. Peripheral nerve regeneration using composite poly (lactic acid caprolactone)/nerve growth factor conduits prepared by coaxial electrospinning. **J Biomed Mater Res A**, v. 96, n. 1, p. 13-20, 2011b.

LOPATINA, T. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth De Novo. **PLoS One**, v.6, n. 3, p. 17899, 2011.

LOPES, H. F. Síndrome Metabólica: Importância do Tecido Adiposo e dos Ácidos Graxos Livres. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, v.14, n.4, p. 567-563, julho/agosto, 2004.

LOWEY, S. et al. Substructure of the myosin molecule: I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. **J Mol Biol**, v. 42, n.1, p. 1-29, 1969.

LOWDON, I.M.R.; SEABER, A.V.; URBANIAK, J.R. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of de Medinaceli. **J Neurosci Methods**, v. 24, n. 3, p. 279-281, 1988.

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

MA, C.L.E. et al. Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. **J Clin Invest**, v. 121, n. 11, p. 4332-4347, 2011.

MACHADO A. **Neuroanatomia Funcional**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

MALAMAN, T.A.B. **Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade e da atividade física na musculatura esquelética de ratos submetidos ao alcoolismo crônico e posterior lesão por impacto padronizada**. 110p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

MALYSZ, T. et al. Exercise training improves the soleus muscle morphology in experimental diabetic nerve regeneration. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 4, p. 571-582, 2011.

MARCOL, W. et al. Reduction of post-traumatic neuroma and epineural scar formation in rat sciatic nerve by application of microcrystallic chitosan. **Microsurgery**, [Epub ahead of print] 2011.

MARTINS, R.S.; SIQUEIRA, M.G.; TEDESCO-MARCHESE, J. Neuroma sintomático do nervo sural: uma complicação rara após a retirada do nervo. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, n. 3, p. 866-868, 2002.

MARTINS, R. S. et al. Electrophysiological evaluation of sciatic nerve regeneration rat, with use of suture, fibrin glue or combination of both techniques. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 63, n.3, p. 601-604, 2005a.

MARTINS, R. S. et al. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. **Arq Bras Neurocir**, v. 24, n. 1, p. 20-25, 2005b.

MAZZER, P. Y. C. N. et al. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. **Acta Ortop Bras**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 220-225, 2006.

MEDALHA, C.C. et al. Low-level laser therapy improves repair following complete resection of the sciatic nerve in rats. **Lasers Med Sci**, [Epub ahead of print] 2011.

MEGENEY, L.A. et al. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. **Genes Development**, v. 10, p. 1173-1183, 1996.

MEGENEY, L.A.; RUDNICKI, M.A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochem Cell Biol**, v. 73, n. 9-10, p. 723-732, Sep/Oct. 1995.

MENDLER, L. et al. Regeneration of reinnervated rat soleus muscle is accompanied by fiber transition toward a faster phenotype. **J Histochem Cytochem**, v. 56, n. 2, p. 111-123, 2008.

MENDONÇA, A.C.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. Directly low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **J Neurosci Methods**, v. 129, p. 183-190, 2003.

MIDHA, R. et al. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. **J Neurosurg**, v. 99, p. 555-565, 2003.

MINAMOTO, V.B. Efeitos da desnervação nos músculos esqueléticos: uma revisão. **Fisioter Mov**, v. 20, n. 3, p. 63-69, 2007.

MOHAMMAD, J. A. et al. Increased axonal regeneration through a biodegradable amnionic tube nerve conduit: effect of local delivery and incorporation of nerve growth factor/hyaluronic acid media. **Ann Plast Surg**, v. 44, n. 1, p. 59-64, 2000.

MOLKETIN, J.D. et al. Cooperative activation of muscle gene expression by MEEF2 and myogenic bHLH proteins. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1125-1136, 1995.

MONTE-RASO, V.V. et al. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. **Rev Bras Fisioter**, v. 10, n. 1, p. 113-119, 2006.

MOORE, A.M. et al. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: a comparative study. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 2, p. 221-234, 2011.

MORAES, L. H. R. 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? 91p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2009.

MÜLLER, H.W.; STOLL, G. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. **Brain Pathol.** v. 9, n. 2, p. 313-325, 1999.

NICKS, D.K. et al. Muscle fiber size and number following immobilization atrophy. **J Anat.** v. 163, p. 1-5, 1989.

OHIRA, Y. et al. The role of neural and mechanical influences in maintaining normal fast and slow muscle properties. **Cells Tissues Organs**, v. 182, p.129–142, 2006.

OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.

OLDFORS, A.; JOHANSSON, B.R. Barriers and transport properties of the perineurium. An ultrastructural study with 125I-labeled albumin and horseradish peroxidase in normal and protein-deprived rats. **Acta Neuropathol**, v. 47, n. 2, p. 139-143, 1979.

OLIVEIRA, A. L. R.; PIERUCCI, A.; PEREIRA, K. B. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. **Braz J Morphol Sci**, v. 21, n. 4, p. 225-231, 2004.

ORSINI, M. et al. Reabilitação motora na plexopatia braquial traumática: relato de caso. **Rev Neurocienc**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 157-161, 2008.

PACHIONI, C.A.S. et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. **Octa Ortop Bras**, v.14, n. 4, p. 203-207, 2006.

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

PAIXÃO, A.P.S. **Morfometria dos músculos sóleo e gastrocnêmio após imobilização na posição encurtada do membro pélvico de ratos, durante 15, 30 e 45 dias.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

PATTERSON, M.F.; STEPHENSON, G.M.M.; STEPHENSON, D.G. Denervation produces different single fiber phenotypes in fast- and slow-twitch hindlimb muscles of the rat. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 291, p. 518–528, 2006.

PEARSE, A.E. **Histochemistry**. Theoretical and applied. 2 ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1968

PEREIRA, C.E.M.; SILVA, J.D.M.; ROMEIRO, V.R. Aspectos éticos da experimentação animal. **Acta Cir Bras**, v. 13, n. 2, 1998.

PETER, J.B. et al. Metabolic profiles of the three fiber types of the skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. **Biochemistry**, v. 11, n. 14, p. 2627 –2633, 1972.

PETTE, D.; STARON, R.S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 116, p. 1–76, 1990.

PETTE, D.; STARON, R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc Res Tech**, v. 50, n. 6, p. 500-509, 2000.

PETTE, D.; VRBOVÁ, G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 120, p. 115–202, 1992.

PETTERSON, J. et al. Muscle recovery after repair of short and long peripheral nerve gaps using fibrin conduits. **Neurosci Lett**, v. 500, n. 1, p. 41-46, 2011.

PICARD, M. et al. Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. **Aging Cell**, v. 10, n. 6, p. 1047-55, 2011.

PIEIDADE, M.C.B. **Avaliação estrutural, estereológica e mecânica do efeito da aplicação do ultrassom no reparo de lesão lacerativa experimental do gastrocnêmio de rato**. 131p. Tese (Doutorado em Fisiopatologia experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PINEDO, U.G. Utilización de prótesis de quitosana y silicona en la regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas. **Arch Neuroci Mex**, v. 6, n. 4, p. 184-193, 2001.

PINTÉR, S.; MENDLER, L.; LÁSZLÓ, D. Neural impacts on the regeneration of skeletal muscles. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 4, p. 1229-1237, 2003.

PIOVESAN, R.F. et al. Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. **Fisioter Mov**, v. 22, n. 2, p. 211-220, 2009.

POLACOW, M.L.O. et al. Estudo morfométrico do músculo sóleo desnervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. **Rev Bras Fisioter**, v. 7, n. 1, p. 77-84, 2003.

PUIGDELLIVOL-SANCHEZ, A. et al. Fast blue and diamidino yeloow as retrograde tracers in peripheral nerves: efficacy of combined nerve injection and capsule application to transected nerves in the adult rat. **J Neurosci Methods**, v. 95, n. 2, p. 103-110, 2000.

PURI, P.L.; SARTORELLI, V. Regulation of muscle regulatory factors by DNABinding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. **J Cell Physiol**, v. 185, p. 155-173, 2000

RAFUSE, V.F.; GORDON, T. Incomplete rematching of nerve and muscle properties in motor units after extensive nerve injuries in cat hindlimb muscle. **J Physiol**, v. 509, n. 3, p. 909-926, 1998.

RAMOS-JUNIOR, E.S. Expressão e localização de fatores regulatórios miogênicos (MyoD e Miogenina) em músculos somíticos de ratos reinervados pela técnica de tubulização. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2009

RANVIER L. Properties et structures differentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. **CR Hebd Seances Acad Sci**, v. 7, p. 2062-2072, 1873.

RANVIER, L. Note sur les vaisseaus sanguins et la circulation dans les muscles rouge. **CR Soc Biol**, v. 26, p. 28-31, 1874.

RIVERO, J.L.; TALMADGE, R.J.; EDGERTON, V.R. Interrelationships of myofibrillar ATPase activity and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. **Histochem Cell Biol**, v. 111, n. 4, p. 277–287, 1999.

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; SCHMALBRUCH, H. Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. **Anat Rec**, v. 243, n. 4, p.430-437, dez. 1995.

ROMÃO, A, M. **Lesão do nervo fibular comum**. Avaliação neuronal, muscular e funcional apósneurotmease parcial: estudo no rato. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

ROSA-JUNIOR, G. M. Enxerto venoso preenchido com gordura no reparo de nervo periférico: uma nova proposta. 115p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2010.

RUTKOWSKI, G. E.; HEATH, C.A. Development of a bioartificial nerve graft. II Nerve regeneration in vitro. **Biotechnol Prog**, v. 18, n. 2, p. 373-379, 2002.

RYAN, V. H. et al. NGF gene expression and secretion by canine adipocytes in primary culture: upregulation by the inflammatory mediators LPS and TNF- α . **Horm Metab Res**, v. 40, p. 1-8, 2008.

SABOURIN, L.A.; RUDNICKI, M.A. The molecular regulation of myogenesis. **Clin Genet**, v. 57, p. 16-25, 2000.

SALONEN, V. et al. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. **Muscle Nerve**, v. 8, n. 2, p. 125-131, 1985.

SANDERLAND, S. **Nervios perifericos y lesions**. 2 ed. Barcelona: Salvat, 1985.

SANTIAGO, LY. et al. Delivery of adipose-derived precursor cells for peripheral nerve repair. **Cell Transplant**, v. 18, n. 2, p. 145-158, 2009.

SASAKI, R. et al. PLGA artificial nerve conduits with dental pulp cells promote facial nerve regeneration. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 5, n. 10, p. 823-830, 2011.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 4, p. 441-447, 2004.

SCHIAFFINO, S. et al. Three myosin heavy chain isoforms in type II skeletal muscle fibres. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 10, n. 3, p. 197-205, 1989.

SCHMALBRUCH, H.; LEWIS, D.M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 4, p. 617-626, 2000.

SCHULTZ, E.; McCORMICK, K.M. Skeletal muscle satellite cells. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 123, p. 213-257, 1994.

SEBBEN, A.D. et al. Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico. **Sci Med**, v. 21, n. 2, p. 81-89, 2011.

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

SEWARD, D.J. et al. bHLH transcription factor MyoD affects pattern in a muscle-specific fashion. **Am j Physiol Cell Physiol**, v. 280, n. 2, p. 408-413, 2001.

SIMÕES, M.J. et al. Use of chitosan scaffolds for repairing rat sciatic nerve defects. **Ital J Anat Embryol**, v. 115, n. 3, p. 190-210, 2010.

SINIS, N. et al. Tissue engineering of peripheral nerves. **Handchir Mikrochir Plast Chir**, v. 38, n. 6, p. 378-389, 2006.

SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Rev Neurocienc**, v. 15, n. 3, p. 226-233, 2007.

SORNELLI F. et al. Brainderived neurotrophic factor: a new adipokine. **Biomed Rev**, v. 18, p. 85-88, 2007.

SOUCY, M.; SEBURN, K.; GARDINER, P. Is increased voluntary motor activity beneficial or detrimental during the period of motor nerve regeneration/reinnervation? **Can J Appl Physiol**, v. 21, n. 3, p. 218-224, 1996.

SPOREL-OZAKAT, R.E. et al. A simple method for reducing autotomy in rats after peripheral nerve lesions. **J Neurosci Methods**, v. 36, n. 2-3, p. 263-265, 1991.

STAL, P. Characterization of the human oro-facial and masticatory muscles with respect to fiber types, myosin and capillaries. **Swed Dent J Suppl**, v. 28, p. 7-45, 1994.

SULLIVAN, J.C.; DAVISON, C.A. Gender differences in the effect of age on electrical field stimulation (EFS)-induced adrenergic vasoconstriction in rat mesenteric resistance arteries. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 296, n. 3, p. 782-788, 2001.

SUNDERLAND, S. The connective tissues of peripheral nerves. **Brain**, v. 88, n. 4, p. 841-854, 1965.

SUNDERLAND, S.; BRADLEY, K. C. Denervation atrophy of the distal stump of a severed nerve. **J Comp Neurol**, v. 93, n. 3, p. 401-409, 1950.

TARAS, J.S.; JACOBY, S.M.; LINCOSKI, C.J. Reconstruction of digital nerves with collagen conduits. **J Hand Surg Am**, v. 36, n. 9, p. 1441-1446, 2011.

TERENGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J Anat**, v. 194, p. 1-14, 1999.

TOBA, T. et al. Evaluation of peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap using a polyglycolic acid (PGA)--collagen nerve conduit filled with laminin-soaked collagen sponge in dogs. **Int J Artif Organs**, v. 25, n. 3, p. 230-237, 2002.

TOSCHI, A. et al. Skeletal muscle regeneration in mice is stimulated by local over expression of V1a-vasopressin receptor. **Mol Endocrinol**, v. 25, n. 9, p. 1661-1673, 2011.

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

VAREJÃO, A.S. et al. Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. **Muscle Nerve**, v. 26, n.5, p. 630-635, 2002.

VECHETTI JÚNIOR, I.J. **Adaptações morfofuncionais e respostas moleculares do músculo esquelético de ratos submetidos ao treinamento aeróbio**. Dissertação (mestrado)- Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

VERDÚ, E. et al. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. **J Peripher Nerv Syst**, v.5, n. 4, p. 191-208, 2000.

VICENT, J.C. et al. Effects of denervation on cell cycle control in laryngeal muscle. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.130, p.1056-1068, sep. 2004.

VITERBO, F. et al. Endo-to-side neurorrhaphy with removal of epineural sheath, an experimental study in rats. **Plast Reconstr Surg**, v. 94, p. 1038-1047, 1994.

VLEGGEERT-LANKAMP, C.L. et al. Type grouping in skeletal muscles after experimental reinnervation: another explanation. **Eur J Neurosci**, v.21, n. 5, 1249–1256, 2005.

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**, v. 21, n. 7, p. 647-653, 2000.

WALTON, R.L. et al. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. **Past Reconstr. Surg**, v. 84, p. 944-952, 1989.

WANG, X. et al. Peroneal nerve regeneration using a unique bilayer polyurethane-collagen guide conduit. **J Bioact Compat Polym**, v.24, n. 2, p. 109-127, 2009.

WASHABAUGH, C.H. et al. Effect of chronic denervation and denervation-reinnervation on cytoplasmic creatine kinase transcript accumulation. **J Neurobiol**, v. 47, n. 3, p. 194-206, 2001.

WEEDS, A.G.; LOWEY, S. Substructure of the myosin molecule II. The light chains of myosin. **J Mol Biol**, v. 61, p. 701-725. 1971.

WEI, Y. et al. Chitosan/silk fibroin-based tissue-engineered graft seeded with adipose-derived stem cells enhances nerve regeneration in a rat model. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, n. 8, p. 1947-1964, 2011.

WEISS, A.; SCHIAFFINO, S.; LEINWAN, L.A. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications to functional diversity. **J Mol Biol**, v. 290, n. 1, p. 61-75, 1999.

WELCH, J.A. Peripheral nerve injury. **Vet Med Surg Semin**, v. 11, n. 4, p. 273-284, 1996.

WERNECK, L.C. O valor da biópsia muscular em neurologia (Análise de 290 exames a fresco e pela histoquímica). **Rev Bras Clin Terap**, v. 10, p. 2 – 24, 1981.

WHITE, J.D., et al. Myotube formation is delayed but not prevented in MyoD-deficient skeletal muscle: studies in regenerating whole muscle grafts of adult mice. *J Histochem Cytochem*, v. 48, p. 1531-1544, 2000.

WOLTERS, M. et al. Comparative electrophysiological, functional, and histological studies of nerve lesions in rats. **Microsurgery**, v. 25, n.6, p. 508-519, 2005.

WRIGHT, W.E.; SASSOON, D.A.; LIN, V.K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. **Cell**, v. 56, n. 4, p. 607-617, 1989.

XU, J.J. et al. Recombinant ciliary neurotrophic factor promotes nerve regeneration and induces gene expression in silicon tube-bridged transected sciatic nerves in adult rats. **J Clin Neurosci**, v. 16, n. 6, p. 812-817, 2009.

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**, v. 164, n. 2, p. 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.

YILMAZ, M. et al. Repair of fractures of the orbital floor with porous polyethylene implants. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 45, n. 8, p. 640-644, 2007.

ZHANG, L.X. et al. Experimental study of low dose ultra shortwave promoting nerve regeneration after acellular nerve allografts repairing the sciatic nerve gap of rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 28, n. 4, p. 501-509, 2008.

ZHONG, H. et al. Effects of inactivity on fiber size and myonuclear number in rat soleus muscle. **J Appl Physiol**, v. 99, n.4, p. 1494-1499, 2005.

ZHOU, Z. et al. Reinnervation-induced alterations in rat skeletal muscle. **Neurobiol Dis**, v. 23, n. 3, p. 595–602, 2006.

Anexos

ANEXO A

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 036/2011

Bauru, 10 de novembro de 2011.

Senhor Professor,

Informamos Vossa Senhoria que o projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Tecido adiposo e enxerto com tubo de polietileno poroso usados na técnica de tubulização influenciaria na reinervação de músculos de contração lenta e rápida de ratos?**, de autoria de Daniel Ventura Dias, sob sua orientação, foi analisado por um relator e considerado **APROVADO "ad referendum"** desta Comissão, nesta data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B

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. Nº 011/2008

Bauru 15 de julho de 2008.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“Enxerto com tubo de polietileno poroso preenchido com gordura no reparo de nervo periférico: uma nova proposta”**, de sua autoria, 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. Luis Antônio de Assis Taveira

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

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