

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Erivan Schnaider Ramos Junior

*Expressão e localização de fatores regulatórios
miogênicos (MyoD e Miogenina) em músculos somáticos
de ratos reinervados pela técnica de tubulização*

Bauru
2009

ERIVAN SCHNAIDER RAMOS JUNIOR

**Expressão e localização de fatores regulatórios miogênicos
(MyoD e Miogenina) em músculos somáticos de ratos reinervados
pela técnica de tubulização**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Estomatologia / Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

**BAURU
2009**

Ramos Junior, Erivan Schnaider

R147e Expressão e localização de fatores regulatórios miogênicos (MyoD e Miogenina) em músculos somíticos de ratos reinervados pela técnica de tubulização. -- Bauru, 2009.
90 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

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

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP: projeto de pesquisa aprovado em 17 de setembro de 2007.

Número do protocolo: 19/2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

ERIVAN SCHNAIDER RAMOS JUNIOR

03 de Dezembro de 1977

Nascimento

Ponta Grossa - Paraná

1996 –2000

Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa
(UEPG)

2007 – 2009

Mestrado em Biologia Oral na Faculdade
de Odontologia de Bauru, Universidade
de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Erivan Schnaider Ramos** e **Marilda Ramos**, responsáveis por tudo isso. Tenho muito orgulho de ser filho dos dois. Obrigado

Ao meu orientador **Jesus Carlos Andreo**, pela amizade, paciência e ensinamentos. Tem meu respeito por ser um profissional extremamente competente. Meus sinceros agradecimentos.

Ao **Prof. Tom**, por estar sempre presente e despertar em todos a vontade de fazer ciência.

Ao pessoal da Anatomia **Geraldo, Luis, Melina** e **Tatiane** pelas horas de trabalho dispensadas para a realização deste trabalho. Obrigado por tudo.

Aos amigos do laboratório de histologia **Elcia, Gabriela**, em especial **Samuel Ferreira Jr, Marcela Claudino** e **Prof. Gustavo Garlet** pela parceria e ajuda no presente trabalho.

A todos do laboratório de microbiologia: **Carla, Thaís, Tati, Hayana, Carol Amore** e em especial à **Prof^a. Ana Paula Campanelli** pela ajuda na imunofluorescência.

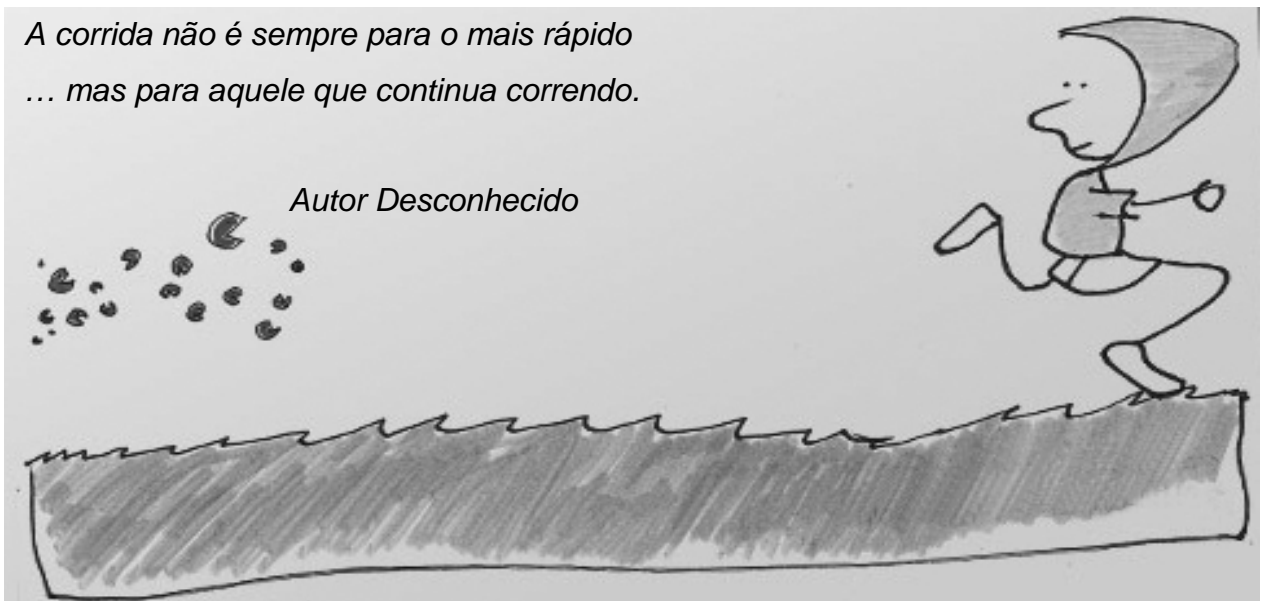
Aos amigos de mestrado e doutorado **Aroldo, Marcus Gustavo, Mileni, Aline, Melaine, Karen, Érica, Bruno (Pato), Bruno Furquim, e Carlos Repeke (Cadu)** por quase 24 horas de convivência diária, amizade e cumplicidade.

Ao **Thiago Dionísio** pela providencial ajuda nas reações de PCR e sua insuperável presteza a todos que o procuram.

Aos amigos das corridas da USP, **Prof. Alexandre, Rubão, Murilo, Murtiça, Eloy** pela amizade e histórias fantásticas das corridas da USP que no futuro merecerão ser eternizadas em um livro.

*A corrida não é sempre para o mais rápido
... mas para aquele que continua correndo.*

Autor Desconhecido



Resumo



RESUMO

As lesões dos nervos periféricos, que inervam os músculos esqueléticos, evoluem para perdas da propriocepção e alterações na morfologia e função das fibras musculares, causando um impacto negativo na qualidade de vidas dos indivíduos. Tais lesões implicam em alteração na expressão de genes específicos do músculo, como por exemplo, na MyoD e Miogenina, atuantes na ativação de células satélites e reguladores da massa muscular. A técnica cirúrgica de tubulização é um recurso empregado na prática clínica para tratamento de músculos que sofreram desnervação. O objetivo do presente estudo foi analisar se a técnica de tubulização com o preenchimento de gordura altera a expressão de MyoD e Miogenina, a morfometria do músculo sóleo de ratos e localização da MyoD e Miogenina. Para isso, 57 ratos *Wistar* foram separados em grupos: controle inicial (GCI); final 45 (GCF45), final 150 (GCF150), desnervado 45 dias (GD45), desnervado 150 dias (GCD150) e grupos experimentais com veia vazia 45 dias (GESP45) e 150 dias (GESP150) e com veia preenchida de gordura 45 dias (GEG45) e 150 dias (GEG150). Para os procedimentos cirúrgicos de desnervação e reinervação e coleta do músculo os animais foram profundamente anestesiados. Após os devidos tempos experimentais, os animais foram sacrificados, o músculo sóleo foi dissecado, envolvido em meio de criopreservação e estocado a -80°C . A quantificação de mRNA do MyoD e Miogenina foi realizada por amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real (RealTimePCR) e a localização da produção de MyoD e Miogenina foi realizada por microscopia confocal a laser e imunofluorescência. A morfometria foi realizada em lâminas coradas com HE, observadas em microscópio ótico e calculadas pelo software Image Pro-Plus 6.2. Os resultados do presente estudo mostraram que houve aumento da expressão do MyoD e Miogenina nos grupos experimentais 45 dias quando comparados ao grupo controle inicial e um decréscimo da expressão de MyoD e Miogenina para os grupos experimentais com 150 dias. A área da secção transversa nos grupos experimentais com 45 dias (GESP45 e GEG45) não apresentaram diferença estatística, quando comparado com grupo desnervado 45 dias (GCD45), enquanto que o grupo experimental com preenchimento de gordura 150 dias (GEG150) obteve os melhores resultados na medida da área da secção transversal do músculo sóleo. As lâminas observadas no microscópio confocal mostram a MyoD e Miogen localizadas no mionúcleo. Concluiu-se que o uso da gordura na técnica de tubulização do nervo ciático de ratos, interfere na regeneração do músculo sóleo.

Palavras chave: Músculo esquelético. Fatores de Regulação Miogênica. Nervos periféricos. Ratos.

Abstract



ABSTRACT

Expression and localization of myogenic regulatory factors (MyoD and Myogenin) in somatic rat muscle after reinnervation with vein graft tubulization

Peripheral nerve injuries can result in the loss of proprioception, morphological and functional alterations of muscle fibers which causes a negative impact on the quality of life. These injuries elicit an alteration on the expression of muscle specific genes, like MyoD and Myogenin, involved in the satellite cell activation and muscle mass regulation. The vein graft tubulization is a well known technique for treatment of denervated muscle. The aim of this work was to investigate if vein graft tubulization filled with fat tissue changes the expression and localization of MyoD and Myogenin and to study if it can modify the morphometry of soleus muscle. Fifty seven Wistar rats were divided in initial control group (ICG), final control group 45 days and 150 days (FCG45; FCG150), denervated 45 days and 150 days (D45; D150) and experimental groups with vein graft 45 days and 150 days (VG45; VG150). and vein graft filled with fat tissue 45 days and 150 days (VF45; VF150). For denervation and reinnervation procedures and muscle biopsy the animals were submitted to anaesthesia and after the experimental time they were euthanized. Soleus muscle was dissected, involved in criopreservation medium and stored at -80°C . It was performed RealTime polymerase chain reaction (RealTimePCR) for MyoD and Myogenin mRNA quantification. The localization of its production was analysed by laser confocal microscopy and immunofluorescence staining. The morphometric analysis were done by Hematoxylin-Eosin staining and examined at optical microscopy using the Image ProPlus 6.2 software. There was an upregulation on the expression of MyoD and Myogenin for the experimental groups at 45 days when compared to the initial control group. On the other hand, we found a downregulation on the MyoD and Myogenin expression in the same groups with 150 days. The area of transversal section in the 45 days experimental groups (VF45, VG45) did not show statistical difference compared with denervated group with 45 days (D45). Moreover, the group filled with fat tissue at 150 days (VF150) presented the best results in the transversal section area of soleus muscle. In addition, the slides analysed under confocal microscopy showed the localization of MyoD and Myogenin in the myonuclei. In conclusion, the application of vein graft filled fat tissue improves the soleus muscle regeneration.

Keywords: Skeletal muscle. Myogenic regulatory factor. Peripheral nerve. Rat.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	MIOGÊNESE NO EMBRIÃO	23
1.2	FATORES DE REGULAÇÃO MIOGÊNICA	24
1.3	MIOGÊNESE NO ADULTO	28
1.4	PLASTICIDADE DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO	29
1.5	LESÃO E RECUPERAÇÃO DE NERVOS PERIFÉRICOS	31
2	PROPOSIÇÃO	35
2.1	OBJETIVO GERAL	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	41
3.1.1	Grupos Controle	41
3.1.2	Grupos Controle Desnervados	41
3.1.3	Grupos Experimentais	42
3.1.3.1	<i>Grupo Experimental Veia Vazia</i>	42
3.1.3.2	<i>Grupo Experimental Veia Preenchida com Gordura</i>	42
3.2	PROTOCOLO CIRÚRGICO	42
3.3	COLETA DE AMOSTRAS	44
3.4	EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA	44
3.5	REAÇÕES DE RealTimePCR	45
3.6	MORFOMETRIA	47
3.7	IMUNOFLUORESCÊNCIA	48
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4	RESULTADOS	51
4.1	EXPRESSÃO DE MyoD E MIOGENINA NO MUSCULO SÓLEO DE RATOS DOS GRUPOS CONTROLES	53
4.2	EXPRESSÃO DE MyoD E MIOGENINA EM MÚSCULOS REINERVADOS PELA TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO SEM O PREENCHIMENTO DE GORDURA	54
4.3	EXPRESSÃO DE MyoD E MIOGENINA EM MÚSCULOS REINERVADOS PELA TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO COM O PREENCHIMENTO DE GORDURA	55
4.4	COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MyoD E MIOGENINA EM MÚSCULOS REINERVADOS PELA TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO COM E SEM O PREENCHIMENTO DE GORDURA	56
4.5	LOCALIZAÇÃO DOS FATORES DE REGULAÇÃO MIOGÊNICA MyoD E MIOGENINA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	57
4.6	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS FIBRAS MUSCULARES	59
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICES	83
	ANEXOS	87

Introdução



1 INTRODUÇÃO

1.1 MIOGÊNESE NO EMBRIÃO

O tecido muscular estriado esquelético é formado por células especializadas na contração muscular, as fibras musculares, que são multinucleadas e os núcleos estão localizados na periferia da fibra, na região subsarcolemal. As fibras musculares estão imersas em uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, que constituem o tecido conjuntivo do músculo. Esse tecido está organizado em três bainhas distintas: o epimísio, que circunda todo o músculo; o perimísio, que divide o músculo em fascículos e o endomísio, que circunda cada fibra muscular. (CRAIG, 1994).

A maioria dos músculos esqueléticos de aves e mamíferos, com exceção de alguns músculos craniofaciais e esofágicos, são formados a partir dos somitos; condensações transitórias do mesoderma paraxial originadas em cada lado do tubo neural do embrião. (POWNALL; GUSTAFSSON; EMERSON, 2002; SUMMERBELL et al., 2000; SUMMERBELL; RIGBY, 2000). Os somitos diferenciam-se ao longo do eixo dorso-ventral do embrião e originam o dermomiótomo, localizado dorsalmente, e o esclerótomo, localizado ventralmente (Figura 1). O dermomiótomo origina a derme e a musculatura esquelética dos membros e tronco, enquanto que o esclerótomo origina a cartilagem e os ossos das vértebras e costelas. (PARKER; SEALE; RUDNICKI, 2003)

A porção epaxial do dermomiótomo origina a musculatura profunda do dorso, a partir de células progenitoras da borda medial dorsal (BMD) que migram profundamente do dermomiótomo, saem do ciclo celular, se alongam e diferenciam-se em fibras musculares. (AMTHOR; CHRIST; PATEL, 1999). Um padrão similar de eventos induz a formação da borda lateral ventral (BLV) para estabelecer o dermomiótomo hipoaxial não migratório, o qual originará a musculatura lateral do tronco. Algumas células da BLV se separam do dermomiótomo e migram ventralmente para regiões de desenvolvimento dos músculos esqueléticos da parede ventral do corpo, da língua, dos membros e do diafragma.

A regulação do processo de formação dos músculos esqueléticos envolve a apropriada ativação, proliferação e diferenciação de várias linhagens de células miogênicas e depende da expressão e atividade de fatores transcricionais, conhecidos como fatores de regulação miogênica.

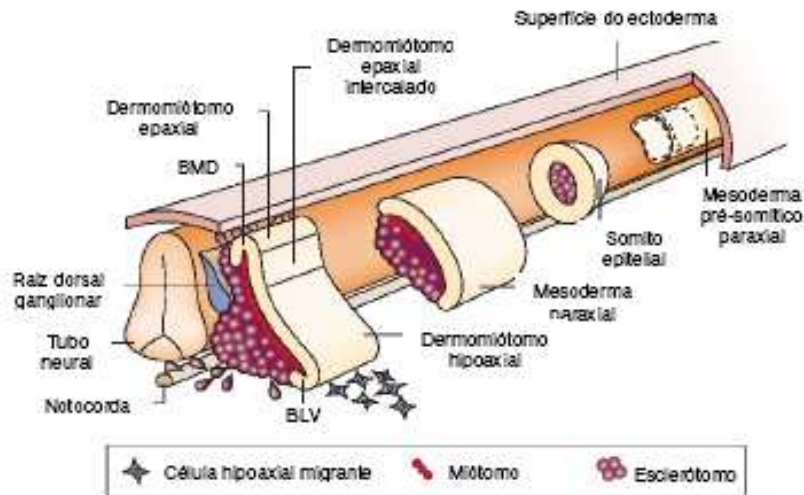


Figura 1 – Origem embrionária dos músculos do tronco e dos membros. O mesoderma paraxial pré-somítico está localizado em cada lado da notocorda. A segmentação do mesoderma paraxial em somitos ocorre ao longo do eixo dorso-ventral e em uma direção cefálica – caudal do embrião. Em resposta a sinais da notocorda e do tubo neural, os somitos se diferenciam e subdividem-se para originar o dermomiótomo e o esclerótomo. Células da borda medial dorsal (BMD) do dermomiótomo migram profundamente do dermomiótomo para formar o dermomiótomo epaxial. Um evento semelhante ocorre na borda lateral ventral (BLV) do dermomiótomo, para a formação do dermomiótomo hipaxial. Algumas células da BLV se separam do dermomiótomo e migram para regiões de desenvolvimento dos músculos da parede ventral do corpo, da língua, dos membros e do diafragma (células hipoxiais migrantes). (PARKER; SEALE; RUDNICKI, 2003) adaptado.

1.2 FATORES DE REGULAÇÃO MIOGÊNICA

Durante o desenvolvimento embrionário, o comprometimento das células somíticas do mesoderma com a linhagem miogênica depende inicialmente de sinais positivos [*Wnts*, *Sonic hedgehog (Shh)*, *Noggin*] ou negativos (*BMP4*) oriundos de tecidos circundantes, tais como a notocorda e o tubo neural. (CHARGE; RUDNICKI, 2004). Esses sinais ativarão os genes responsáveis por transformar células não musculares em células com um fenótipo muscular.

Os genes responsáveis por essa transformação são membros da família dos fatores transcricionais “basic helix-loop-helix” (bHLH) (figura 2), da qual fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF4; coletivamente chamados de fatores de regulação miogênica (do inglês, *myogenic regulatory factors* ou MRFs). Os MRFs compartilham um domínio homólogo bHLH, que é necessário para a ligação com o DNA e para a dimerização com fatores transcricionais da família da proteína E. Os heterodímeros MRF-proteína E e os monômeros de MRFs ligam-se a seqüências de DNA (5´-CANNTG-3´), conhecidas como *Ebox*, presentes na região promotora de vários genes músculo – específicos, levando à expressão dos mesmos. (LASSAR et al., 1991; MURRE, 1999).

Assim como os MRFs, a família de fatores transcricionais MEF2 (do inglês, *myocyte enhancer factor-2*) também está envolvida na ativação de genes específicos do músculo. A família Mef2 consiste em quatro membros, Mef2A-D, cada um deles é codificado em genes separados. Enquanto a expressão de MRFs é restrita ao tecido muscular, genes MEF2 são expressos amplamente durante o desenvolvimento. (BERKES; TAPSCOTT, 2005).

O MEF2 da família dos fatores regulatórios MADS-box, participa junto com os membros da família MyoD na regulação da diferenciação do músculo esquelético. Os fatores MEF2, por si só, não especificam o destino do músculo, mas eles estão presentes em estágios iniciais do desenvolvimento, onde interagem com MyoD para iniciar expressão gênica da célula muscular. (MOLKENTIN et al., 1995). As MEF2 são ativadores transcricionais que se ligam em seqüências de DNA ricas em A+T encontrados em muitos genes músculos específicos, incluindo aqueles que codificam proteínas contráteis e o diferenciador muscular miogenina (Myog) Estes fatores são expressos nos músculos e parecem ter um papel na diferenciação terminal de células musculares em uma ampla variedade de animais. (BRYSON-RICHARDSON; CURRIE, 2008).

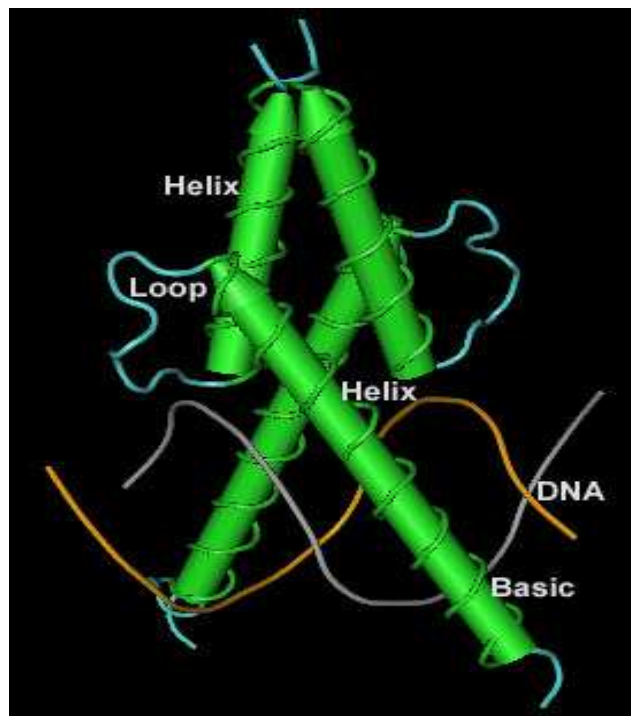


Figura 2 – Estrutura cristalográfica do complexo formado pelo dímero do fator transcrricional da família “basic Helix-Loop-Helix” (bHLH) MyoD e o DNA – adaptado (MA et al., 1994).

Na diferenciação do músculo esquelético, o comprometimento das células somáticas do mesoderma com a linhagem miogênica é marcado pela expressão dos MRFs Myf5 e MyoD (Figura 3). Isso é demonstrado pela total ausência de tecido muscular em camundongos duplo *Knockout MyoD:Myf5* e pela observação de que, nesses animais, as supostas células progenitoras musculares permanecem multipotentes e contribuem para tecidos não musculares do tronco e dos membros desses camundongos. (KABLAR et al., 1998; PALMER et al., 2001; RUDNICKI et al., 1993). As células da linhagem miogênica em proliferação, positivas para Myf5 e/ou MyoD, são então denominadas de mioblastos. (MEGENEY; RUDNICKI, 1995).

Embora a MyoD e o Myf5 definam a identidade dos mioblastos, as células precursoras somáticas devem ser “pré-comprometidas” com a linhagem miogênica antes da expressão dos MRFs. No embrião, esse “pré-comprometimento” é realizado pelo fator transcrricional Pax3, da família Pax (do inglês, *paired-box*), o qual é expresso em células do mesoderma pré-somítico e dos primeiros somitos epiteliais. (GOULDING; LUMSDEN; PAQUETTE, 1994; WILLIAMS; ORDAHL, 1994). Já no dermomiótomo, as células precursoras, que apresentam expressão de Pax3 induzida por sinais secretados pelo mesoderma da placa lateral e pelo ectoderma

superficial, são mantidas como uma população não diferenciada e em proliferação; contribuindo assim para a expansão das células da linhagem miogênica. (AMTHOR; CHRIST; PATEL, 1999).

Os mioblastos que saem do ciclo celular, positivos para Myf5 e MyoD, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão dos MRFs miogenina e MRF4, os quais regulam a diferenciação dessas células em fibras musculares (Figura 3). (MEGENEY; RUDNICKI, 1995). Embriões deficientes em miogenina morrem no período perinatal devido à deficiência na diferenciação dos miócitos, evidenciada pela quase total ausência de fibras musculares nesses mutantes (HASTY et al., 1993). Similarmente, camundongos deficientes em MRF4 demonstram uma série de fenótipos consistentes com seu papel na diferenciação dos miócitos durante a miogênese. (PATAPOUTIAN et al., 1995; RAWLS et al., 1995; YOON et al., 1997; ZHANG; BEHRINGER; OLSON, 1995).

Finalmente, no processo de miogênese, os miócitos mononucleados se fundem para formar os miotubos (Figura 3) e, no animal adulto, o músculo esquelético torna-se um tecido altamente especializado caracterizado por fibras musculares multinucleadas. (SCHMALBRUCH; LEWIS, 2000).

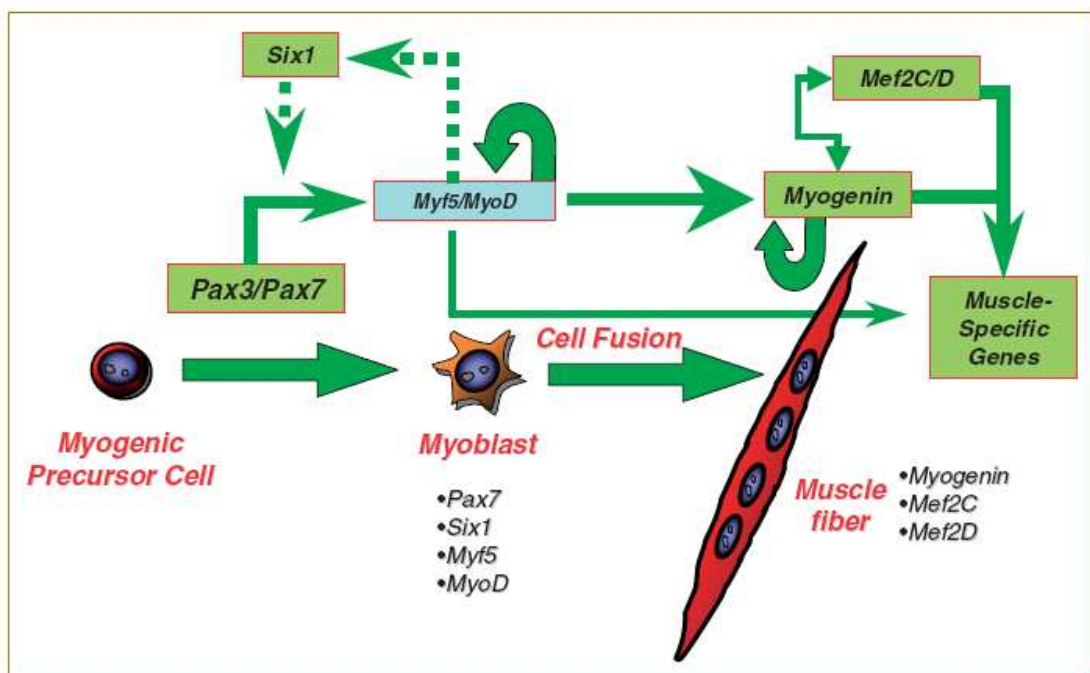


Figura 3 – Rede regulatória da diferenciação muscular. (RUDNICKI et al., 1993) modificado.

1.3 MIOGÊNESE NO ADULTO

Sobre a lâmina basal de músculos adultos repousam pequenas células mononucleadas progenitoras musculares chamadas células satélites (CS). Em um músculo adulto saudável estas células são mitoticamente quiescentes e não expressam marcadores de diferenciação. (BAILEY; HOLOWACZ; LASSAR, 2001). Estes progenitores adultos surgem de células progenitoras derivadas dos somitos em músculos embrionários e neonatais não só contribuindo para a regeneração muscular como também na sua auto-renovação. Em seu estado não proliferativo, as CS expressam genes regulatórios, incluindo Pax7, o qual é essencial para a formação das CS. (SEALE; ASAKURA; RUDNICKI, 2001; SEALE et al., 2000). Em resposta a uma injúria no músculo, as CS iniciam proliferação e ativação de Myf5 e MyoD e depois Miogenina, Myf6 e outros genes de diferenciação.

O regulador chave da biogênese das células satélites parece ser o PAX7. Camundongos mutantes para Pax7 mostram uma severa redução no número de células satélites. Em contraste, neonatos de camundongos mutantes para Pax7 tem um nível significativo de células satélites, o qual são progressivamente perdidas por apoptose. (SEALE et al., 2000). Exatamente como o PAX7 regula a miogênese adulta tem sido o foco de intensivas investigações. Recentes análises sugerem que PAX7 regulam a expressão de Myf5 em mioblastos derivados de células satélites. O nosso atual entendimento sobre o modo de ação do PAX7 sugere um processo de ativação seqüencial no qual células progenitoras PAX7-positivas ativam a expressão de Myf5 (Figura 4), depois MyoD e outros MRFs, os quais conseqüentemente iniciam a expressão de genes responsáveis pela diferenciação (Myog e Myf6). (BRYSON-RICHARDSON; CURRIE, 2008).

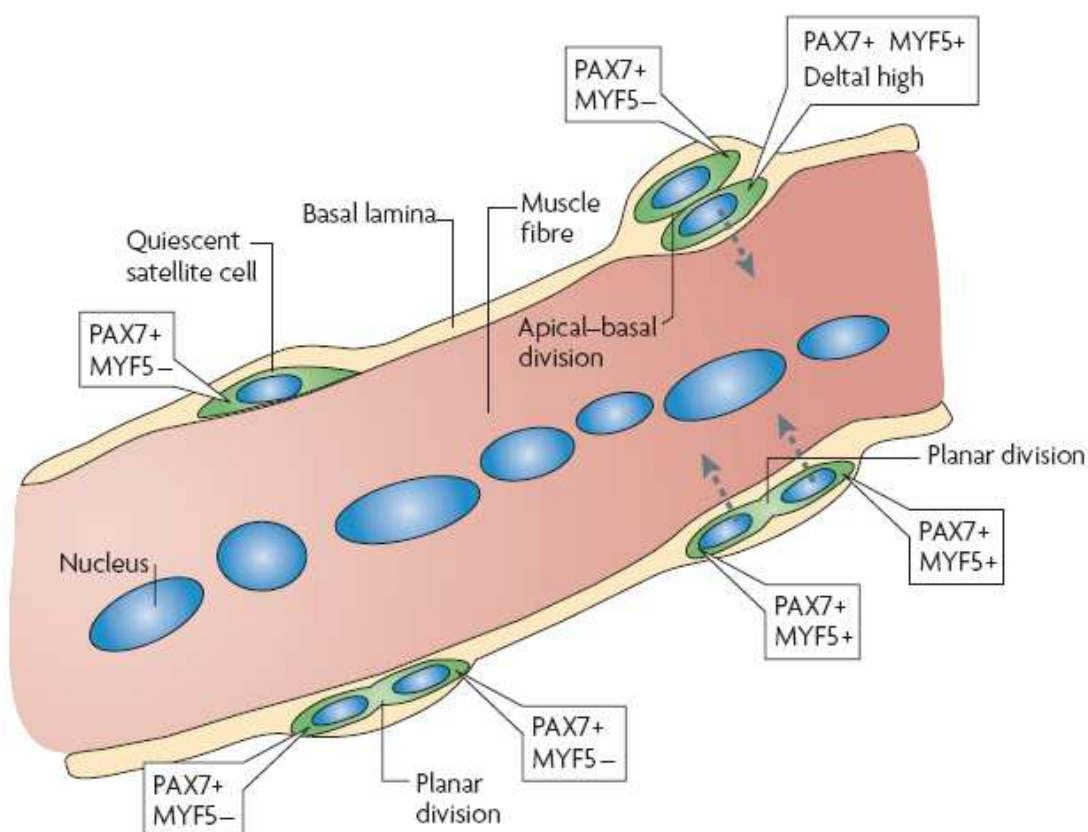


Figura 4 – Miogenese no adulto: Células satélite quiescentes são marcadas pela expressão de PAX7, met proto oncogene (MET), M-Caderina e outros marcadores de células satélite e diferem das células satélite não quiescentes comprometidas com o destino de progenitoras musculares, pela expressão de Myf5.

1.4 PLASTICIDADE DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

A perda da inervação, não apenas pela desnervação experimental, mas também por acidentes, leva à deterioração fisiológica e funcional das fibras afetadas (BORISOV; CARLSON, 2000; BORISOV; DEDKOV; CARLSON, 2001; BORISOV; HUANG; CARLSON, 2000; DEDKOV et al., 2001; GUTMANN, 1969), redução no peso do músculo e área de secção transversal das miofibras (DESCHENES; MARESH; KRAEMER, 1997).

A área de secção transversal é uma das propriedades mais importantes dos músculos estriados, porque ela é usada como um dos parâmetros para se determinar a força máxima que um músculo pode produzir sob condições isométricas. (CAIOZZO, 2002; WOLEDGE, 1998). A área de secção transversal de

uma fibra muscular é regulada por vários caminhos e/ou mecanismos. Estudos têm mostrado uma relação direta entre a área de secção transversal de uma fibra muscular e o número de mionúcleos. (ROSSER; DEAN; BANDMAN, 2002). Assim, a condição de hipertrofia está associada a um aumento de mionúcleos enquanto que a atrofia das fibras musculares esta associada com a perda de mionúcleos. (SCHMALBRUCH; LEWIS, 2000).

Se a desnervação ocorrer por um período mais longo, pode induzir as miofibras à apoptose (YOSHIMURA et al., 1999) e ativação e proliferação das células satélites, que são células miogênicas precursoras do músculo esquelético adulto. (VIGUIE et al., 1997).

Apesar de alguns pesquisadores dizerem, que atividade neural aumentada induz a hipertrofia muscular (ISHIHARA et al., 1998), enquanto que sua ausência, tais como desnervação, resulta em atrofia muscular (HYATT et al., 2003), outros afirmam que após a desnervação de um músculo ocorre um aumento na proliferação e diferenciação de células satélites (HYATT et al., 2003; MURRAY; ROBBINS, 1982b, 1982a), mas que o tecido muscular não pode ser mantido após um longo período de desnervação. (IRINTCHEV; WERNIG, 1994).

Apesar de um tanto paradoxal, o que se encontra na literatura é que o músculo estriado desnervado conduz a um acelerado nível de ativação de células satélites (VIGUIE et al., 1997), e que a desnervação por longo período leva a uma queima destas células e subseqüentemente morte das fibras musculares devido uma inabilidade para manter o número apropriado de mionúcleos. (SCHMALBRUCH; LEWIS, 2000).

Para tentar explicar este fato, deve ser lembrado que os músculos possuem proteínas que pertencem aos fatores regulatórios miogênicos (MyoD e Miogenina) e estas proteínas são consideradas marcadores de desenvolvimento e hipertrofia do músculo estriado, porque elas modulam a divisão celular de células satélites e a sua incorporação como novo núcleo dentro da fibra muscular madura.

Os fatores de regulação miogênica são expressos no tecido muscular estriado vivo em várias situações e em resposta a diversos estímulos, sugerindo que eles desempenhem um papel importante na plasticidade deste tecido. (ISHIDO; KAMI; MASUHARA, 2004b, 2004a). Alguns trabalhos têm mostrado que a expressão de

fatores regulatórios miogênicos é rapidamente induzida em músculos estriados desnervados (HYATT et al., 2003; WALTERS; STICKLAND; LOUGHNA, 2000), e alguns pesquisadores consideram que este fato seria para prevenir a atrofia muscular. (VOYTIK et al., 1993; WALTERS; STICKLAND; LOUGHNA, 2000).

1.5 LESÃO E RECUPERAÇÃO DE NERVOS PERIFÉRICOS

Lesões nervosas periféricas seguidas de axoniotmesis, geralmente, são reparadas através de sutura das duas extremidades. Esta técnica, porém, só é possível se o segmento nervoso lesado for de pequena extensão. Nas lesões mais extensas, tais suturas criam situações de tensão, prejudicando a irrigação local. (TERZIS; FAIBISOFF; WILLIAMS, 1975)

Vários pesquisadores afirmam que, em geral, secções nervosas com mais de 3 cm de comprimento são inadequadas para simples conexões, como as suturas epineurais, sendo mais indicado o enxerto autólogo de um nervo sensitivo, como o nervo sural, do próprio paciente. (MILLES, 1982a, 1982b). Limitações, como o calibre do nervo lesado, levam à utilização dos chamados “cable graft”, em que diversos segmentos do nervo doador são utilizados. A grande desvantagem desta técnica é a necessidade de um grande número de suturas que, via de regra, resulta na formação de cicatriz com conseqüente isquemia na região do implante. Além disso, o emprego de grande quantidade de “nervo doador” leva a uma perda de sensibilidade na região previamente inervada pelo mesmo. (FAWCETT; KEYNES, 1986).

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

Heijke; Klopper; Dutrieux (1993) estudaram a regeneração do nervo safeno em coelhos utilizando enxerto venoso e não obtiveram resultados satisfatórios. Estes autores consideraram a hipótese de que o contato entre as células endoteliais do segmento venoso transplantado e o tecido nervoso tenha estimulado o

desenvolvimento de tecido conjuntivo da parede do vaso, o que culminou com a constrição periférica do nervo antes deste iniciar sua regeneração.

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

Outros autores concordam que a utilização de enxertos venosos pode ser útil apenas em secções nervosas de reduzido tamanho e em nervos monofasciculados. (WALTON et al., 1989). Entretanto, ao utilizar enxertos venosos ao avesso em nervos mistos, como o nervo ciático, foi observada grande melhora na capacidade regenerativa das fibras nervosas. (FERRARI et al., 1999; RODRIGUES ADE; SILVA, 2001; WANG et al., 1995; WANG et al., 1993)

O colágeno e a laminina têm um efeito benéfico na regeneração nervosa periférica (LANDER; FUJII; REICHARDT, 1985). Ferrari et al. (1999); Valentini et al. (1987) demonstraram que o enxerto venoso ao avesso, expondo a túnica adventícia ao contato direto com axônios seccionados, constitui num bom conduto para a regeneração de nervos com característica sensitiva, como o nervo safeno. Segundo estes autores, tal conduto, além de permeável a fatores externos, encontra-se “carregado” com fatores tróficos (tais como colágeno, laminina e fibronectina) em proporções ideais, propiciando um micromeio altamente favorável à regeneração axonal. Verifica-se, portanto, a relação entre a túnica adventícia (rica em adipócitos na sua parte mais externa) do vaso sanguíneo enxertado exposta ao axônio lesado e a eficácia da regeneração nervosa. Castaneda; Kinne (2002) utilizaram enxerto preparado a partir do omento maior, rico em gordura, para recuperar nervo ciático de ratos transeccionado experimentalmente e observaram uma recuperação funcional significativa nos animais submetidos a essa técnica.

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

Muitos laboratórios em todo o mundo estão utilizando células tronco adulta extraída de lipoaspiração. É sabido que tais células extraídas da gordura não precisam ser cultivadas por três semanas como outros tipos de células tronco. Assim, em apenas 2 horas milhares de células podem estar aptas para implantes. (D'ANDREA et al., 2008; NIEMELA et al., 2007). Por conta da facilidade em se obter gordura, mínimo prejuízo para o organismo e principalmente pela característica em relação às células tronco descritas acima, resolvemos utilizar a gordura no reparo de nervo seccionado experimentalmente objetivando contribuir com nova técnica no reparo de nervo lesionado com perda tecidual.

Proposição



2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

Observar no músculo sóleos de ratos, se o uso da gordura na técnica de tubulização do nervo ciático interfere na regeneração deste músculo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Observar no músculo sóleos de ratos, se o uso da gordura na técnica de tubulização do nervo ciático, interfere:

- a) Na expressão e localização dos fatores regulatórios miogênicos (MyoD e Miog) deste músculo;
- b) Na morfometria das fibras do músculo sóleos de ratos reinervados, deste músculo.

Material e Métodos



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 57 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.

Em cada caixa foram mantidos cinco animais, que receberam água e ração “*ad libitum*”, respeitando ciclos de 12 horas de luz, em temperatura média de 24°C.

O rato foi escolhido para este estudo devido ao fato que essa espécie, e especialmente o macho, é uma das mais freqüentemente usadas na investigação de reparo de nervos periféricos e músculos desnervados. (SCHMALBRUCH, 1967; SCHMALBRUCH; LEWIS, 2000). Os 57 animais foram distribuídos em nove grupos, sendo, cinco controles, e quatro experimentais. Os grupos controles eram formados por 5 animais cada um e os experimentais por 8 animais cada um.

3.1.1 Grupos Controle

Nestes grupos os animais foram sacrificados, como descritos posteriormente, no início do experimento (dia 0), 45 e 150 dias após o início dos experimentos e receberam os nomes de GCI (Grupo Controle Inicial), GCF45 (Grupo Controle Final 45 dias) e GCF150 (Grupo Controle Final 150 dias), respectivamente. Os animais destes grupos serão usados como controles positivos.

3.1.2 Grupos Controle Desnervados

Os animais destes grupos foram sacrificados nos tempos de 45 e 150 dias após a cirurgia de desnervação e receberam os nomes de GCD45 (Grupo Controle

Desnervado 45 dias) e GCD150 (Grupo Controle Desnervado 150 dias), respectivamente. Os animais destes grupos foram usados como controles negativos somente para a análise morfométrica.

3.1.3 Grupos Experimentais

3.1.3.1 Grupo Experimental Veia Vazia

Os animais deste grupo foram submetidos à cirurgia de tubulização, como descrito no protocolo cirúrgico e foram sacrificados nos tempos de 45 dias e 150 dias e receberão os nomes de GESP45 (Grupo Experimental Veia sem preenchimento 45 dias) e GESP150 (Grupo Experimental Veia sem preenchimento 150 dias) respectivamente.

3.1.3.2 Grupo Experimental Veia Preenchida com Gordura

Os animais deste grupo foram submetidos à cirurgia de tubulização, como descrito no protocolo cirúrgico e foram sacrificados nos tempos de 45 dias e 150 dias e receberão os nomes de GEG45 (Grupo Experimental Veia Gordura 45 dias) e GEG150 (Grupo Experimental Veia Gordura 150 dias) respectivamente.

3.2 PROTOCOLO CIRÚRGICO

Todos os animais dos grupos experimentais passaram pelas seguintes etapas:

- 1) Anestesiados, com injeção intramuscular de Cloridrato de Tiletamina, associado com Cloridrato de Zolazepam) na região dorso lateral da coxa esquerda, na dosagem de 50mg/Kg.

- 2) Submetidos à tricotomia da face dorso-lateral do membro pélvico direito e da face ventral do pescoço.
- 3) Submetidos às técnicas assépticas para os procedimentos cirúrgicos.
- 4) Retirada da veia jugular externa – para isso foi efetuada uma incisão paramediana de aproximadamente dois centímetros de comprimento, na face ventral do antímero esquerdo do pescoço dos animais. A seguir a pele e a tela subcutânea foram rebatidas, e efetuadas a divulsão dos músculos subjacentes para exposição e dissecação da veia jugular externa, promovendo o isolamento da mesma e ligadura de suas tributárias. Na seqüência foi realizada uma pequena incisão na veia jugular externa, para que fosse introduzido no interior da mesma, uma cânula de plástico de mais ou menos 1,5 cm de comprimento. A seguir o segmento da veia com o tubo plástico no seu interior foi seccionado e retirado do animal. Após a retirada da cânula do interior da veia a mesma foi mantida em solução fisiológica, a temperatura ambiente, até sua utilização fina na fase da tubulização do nervo ciático. Na seqüência, a pele a pele foi suturada com fio de sutura de algodão 4-0.
- 5) Tubulização do nervo ciático – para isso os animais foram colocados em decúbito ventral numa placa de cortiça, fixando-se as suas patas com fita adesiva. Na seqüência foi realizada uma incisão longitudinal, de aproximadamente dois centímetros de comprimento, na face dorso lateral da coxa direita, rebatendo-se a pele, a tela subcutânea, divulsão do músculo adjacente para exposição e dissecação do nervo ciático. A seguir foi retirado do nervo ciático um segmento medindo cerca de um centímetro, e o segmento da veia jugular externa que estava no soro foi ligada ao coto proximal e distal do nervo, com fio de sutura mononylon 10-0. Nos animais dos GESP a veia unida ao nervo não tinha nenhuma substância no seu interior, mas nos animais dos grupos GEG a mesma foi preenchida gordura “in natura” retirada da região do pescoço. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas aquecidas com luz incandescente para evitar hipotermia e total recuperação após cirurgia.

3.3 COLETA DE AMOSTRAS

Para coleta do músculo sóleo os animais foram inicialmente anestesiados conforme descrição anterior e após a retirada do músculo os animais foram sacrificados com uma dosagem três vezes a da anestesia.

Após a anestesia foi realizada incisão, de mais ou menos quatro cm, no sentido longitudinal, da pele e tecido subcutâneo na região dorso lateral do membro pélvico direito, para expor a musculatura. A seguir o músculo gastrocnêmio foi rebatido para expor o músculo sóleo, e na seqüência o músculo sóleo foi retirado.

As amostras do músculo sóleo foram coletadas para distintos métodos de investigação, para extração de RNA e transcrição reversa e RealTimePCR, análise histológica e morfométrica, e imunofluorescência.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para a extração de RNA e posterior análise de expressão gênica, foram coletados os músculos sóleo de quatro animais por grupo experimental e três animais dos grupos controle inicial (GCI), controle final 45 dias (GCF45) e grupo controle final 150 dias (GCF150). As amostras foram então fragmentadas com auxílio de uma tesoura, transferidas para um tubo “eppendorf” contendo Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA), e armazenadas a -80°C (para as análises de expressão gênica).

A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol, seguindo protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies, EUA). Brevemente, após a coleta de cada amostra, estas eram fragmentadas com auxílio de uma tesoura (autoclavada e tratado com água DEPC), e transferidas para um tubo tipo “eppendorf”, ao qual foi adicionado o reagente Trizol (na proporção de 1 ml de Trizol para cada 1mg de tecido), sendo agitado por 30 segundos e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 ml da suspensão foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio (Sigma), sendo as amostras centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C . A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em “vortex” e

incubado por 24 horas a -20°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a $12000g$ por 15 minutos a 4°C . O precipitado foi lavado em etanol 100%, e novamente centrifugado a $8000g$ por 5 minutos sendo então seco a temperatura ambiente, com o tubo invertido sobre um papel de filtro. As amostras de RNA foram suspensas em $12\mu\text{l}$ de água deionizada e livre de RNase, sendo então as amostras armazenadas a -80°C . Uma alíquota de $1\mu\text{l}$ foi utilizada para determinar a concentração de RNA/ μl nas amostras, usando o aparelho espectrofotômetro (PHARMACIA, ULTROSPEC 2000). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (Superscript III – Invitrogen Life Technologies) utilizando $2\mu\text{g}$ de RNA; e tendo como volume final de reação $25\mu\text{l}$.

3.5 REAÇÕES DE RealTimePCR

A expressão quantitativa de genes MyoD e Myogenina foram analisadas através de reações de RealTimePCR, utilizando-se o sistema SYBRGreen em um aparelho ABI5700 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Primers adequados para tais reações foram criados a partir de seqüências de mRNA para os genes alvos, do programa Primer Express (Applied Biosystems), e se encontram descritos, assim como as propriedades de cada reação (concentração de primer utilizada, temperatura de annealing, temperatura de melting, tamanho do fragmento de amplificação) na tabela 1.

Para as reações de RealTimePCR, foram utilizados $13\mu\text{l}$ do reagente SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems; que contém o fluoróforo SYBRGreen 1; a enzima polimerase AmpliTaq Gold; DNTPs com dUTP; o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência; e os demais componentes de tampão, já devidamente otimizados), $1\mu\text{l}$ da solução de cDNA (sintetizado como previamente descrito), $9\mu\text{l}$ de água MiliQ tratada com DEPC, e $2\mu\text{l}$ da solução contendo cada primer (a partir de uma solução stock, na qual cada primer se encontra na concentração de $0,5\mu\text{M}$).

Tabela 1 – Seqüência de primers e propriedades de reação.

Alvo	Gen bank	Sense e anti-sense	tA (°C)	tM (°C)	BP
MyoD	NM_176079. 1	GGAGACATCCTCAAGCGATGC GCACCTGGTAAATCGGATTG	58	82	104
Myogenin	NM_017115. 2	ACTACCCACCGTCCATTAC TCGGGGCACTCACTGTCTCT	58	83	233
S16	XM_341815. 3	CGTGCAGGTCTTCGGACGCA CCGAATATCCACACCAGCAA	58	76	181

At: temperatura de anelamento; Mt: temperatura de melting; bp: pares de base, tamanho do amplicon.

Foram preparadas alíquotas de modo a ajustar a concentração ideal de primer a ser utilizada em cada reação para o volume de 2µl; as informações de cada primer utilizado estão descritas na Tabela 1. A reação de amplificação compreende basicamente 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 45 segundos a 58°C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Variações na temperatura de annealing para cada primer utilizado estão descritas no na tabela 1.

Previamente, as reações de RealTimePCR foram otimizadas com relação às concentrações ideais de cada par de primers e temperatura de annealing, de modo a maximizar eficiência e a especificidade de amplificação (exemplificado no Apêndice B). Durante a padronização, os produtos de amplificação também foram submetidos à eletroforese em gel de poli-acrilamida 6%, corados com nitrato de prata 0.2% diluído em água bidestilada, e analisados quanto a sua especificidade através da análise no gel (análise do tamanho do fragmento de amplificação em comparação a padrões de peso molecular, e análise da presença ou ausência de bandas inespecíficas). O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras (o termociclador ABI5700 associado ao Software ABI Prism, Applied Biosystems) através da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação nucleases fluorogênicas (SYBRGreen 1) aos produtos de amplificação durante o curso da reação.

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cicle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras, atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado; (exemplificado no Apêndice A). Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para a 16S, um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação; assim como os níveis de expressão de 16S foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos primers utilizados Para as reações de RealTimePCR, foram utilizadas independentemente amostras de cDNA proveniente do RNA extraído do tecido muscular de 4 animais de cada grupo experimental, coletados nos tempos de 45 e 150 dias após a cirurgia. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de 16S, obtidos de 4 animais de cada grupo.

3.6 MORFOMETRIA

Para esta metodologia foram utilizados três animais de cada grupo.

As amostras coletadas para a morfometria das fibras musculares foram envolvidas em meio de criopreservação Tissue-Tek e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80°C para posterior análise morfométrica. Destas amostras foram coletados cortes de $10\mu\text{m}$, obtidos em criostato (Leica, CM 1850), transferidos para lâminas de microscopia e corados com hematoxilina e eosina conforme protocolo seguido pelo laboratório de histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Para realização da morfometria foi calculada a área da secção transversa de 100 fibras musculares do músculo sóleo de cada animal. Para isso foi utilizado um micro computador com o software de captura e análise de imagem Image Pro-Plus 6.2, acoplado ao microscópio óptico Olympus BX-50.

A morfometria do músculo foi realizada para verificar a eficiência da regeneração nervosa nos diferentes grupos, observação de morfologia geral e padrão de congelamento.

3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para esta metodologia foram 3 animais de cada grupo.

As amostras musculares foram envolvidas em talco neutro em seguida embebidas em meio para congelamento (Tissue Tek) e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posterior processamento e corte em criostato. Destas amostras foram obtidos cortes de $10\mu\text{m}$, por meio de criostato Leica CM 1850, os quais foram transferidos para laminas silanizadas e fixados em acetona gelada por 10 minutos. Depois de fixados, as laminas foram lavadas em PBS por 30 minutos e posteriormente incubadas com PBS 10% FBS (Fetal Bovine Serum) por 60 minutos para bloqueio de marcação inespecífica. Após, as laminas foram incubadas com anticorpo primário diluídos em PBS/saponina 0,01% e deixadas overnight a 4°C . Foram utilizados anticorpos primários contra Myod (anticorpo policlonal de coelho anti-myod, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:100) e contra Miogenina (anticorpo policlonal de coelho anti-miogenina, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:100).

Após o anticorpo primário, as laminas foram retiradas da geladeira 30 minutos antes do procedimento para estabilizar a temperatura, lavadas com PBS (3 vezes por 2 minutos) e incubadas com anticorpo secundário conjugados com fluoresceína Texas Red[®] Anti-Rabbit IgG (H+L) (Vectors Lab, diluição 1:100) e rabbit anti-goat IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:100) por 2 horas a temperatura ambiente, em seguida lavado em PBS (10 vezes por 2 minutos cada). As laminas foram finalizadas com meio de montagem (VECTASHIELD HardSet Mounting Medium with DAPI, Vectors Lab) e armazenadas em congelador -20°C ao abrigo de luz para posterior observação em microscópio a laser confocal (TCS mode, SPE, Leica, Mannheim, Germany).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Para todas as análises, valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos foram aplicados através do programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc, EUA).

Resultados



4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DE MyoD E MIOGENINA NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS DOS GRUPOS CONTROLES

Nosso primeiro passo foi caracterizar a cinética de expressão de MyoD e miogenina durante o desenvolvimento normal do músculo sóleo de ratos nos períodos de 0, 45 e 150 dias de após o início dos experimentos (Figura 5).

A expressão de MyoD e nos grupos controle inicial (GCI), grupo controle final 45 dias (GCF45) e grupo controle final 150 (GCF150) não apresentaram diferença estatística significativa (GCI vs GCF45 vs GCF150 $p > 0,05$). A expressão de Miogenina também não apresentou uma diferença estatística significativa quando comparamos os grupos controle inicial (GCI), grupo controle final 45 (GCF45) e grupo controle final 150 (GCI vs GCF45 vs CGF150 $p > 0,05$).

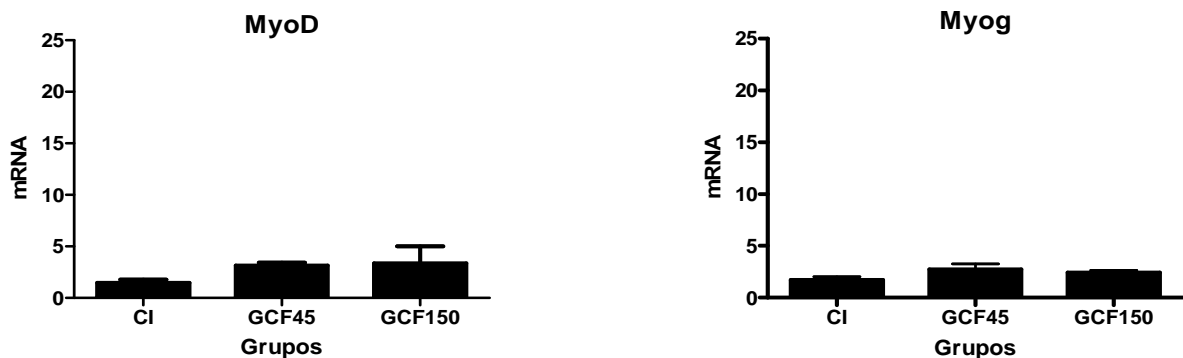


Figura 5 – Expressão de MyoD e Miogenina no músculo sóleo de ratos do grupo controle inicial com 45 (GCF45) e 150 (GCF 150) dias após início do experimento. Amostras de tecido muscular de ratos (*ratus norvegicus*) não foram submetidos a qualquer protocolo cirúrgico. Foram coletados, o RNA total extraído e o nível de expressão de MyoD e Miogenina foi analisado por RealTimePCR. O resultado apresentado representou o valor da média \pm SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de 16S, obtidos de 3 animais em cada tempo.

4.2 EXPRESSÃO DE MyoD E MIOGENINA EM MÚSCULOS REINERVADOS PELA TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO SEM O PREENCHIMENTO DE GORDURA

Conhecendo as características e funções de Myod e Miogenina de músculos em regeneração. Nosso passo seguinte foi caracterizar a cinética de expressão de MyoD e miogenina durante o a reinervação do músculo sóleo de ratos nos períodos de 45 e 150 dias usando a técnica de tubulização sem o preenchimento com gordura (Figura 6).

Na expressão de Myod observamos uma cinética diferente, com um aumento de expressão no grupo GESP45 quando comparado com GCI ($p < 0,05$ GCI vs GESP45) e um forte declínio na expressão no grupo GESP150 quando comparado com GESP45 ($p < 0,05$ GESP45 vs GESP150) se aproximando do nível de expressão de GCI ($p > 0,05$ GCI vs GESP150). A expressão de Myog 45 e 150 dias após a cirurgia de tubulização sem o preenchimento de gordura apresentou um aumento de expressão significativa estatisticamente se comparado com o controle inicial ($p > 0,05$ GESP45 vs GESP150 vs GCI). Após 150 dias (GESP 150) da cirurgia de tubulização observamos leve aumento da expressão mRNA quando comparado ao grupo sem preenchimento 45 dias (GESP45) mas sem diferença estatística ($p > 0,05$ GESP150 vs GESP45).

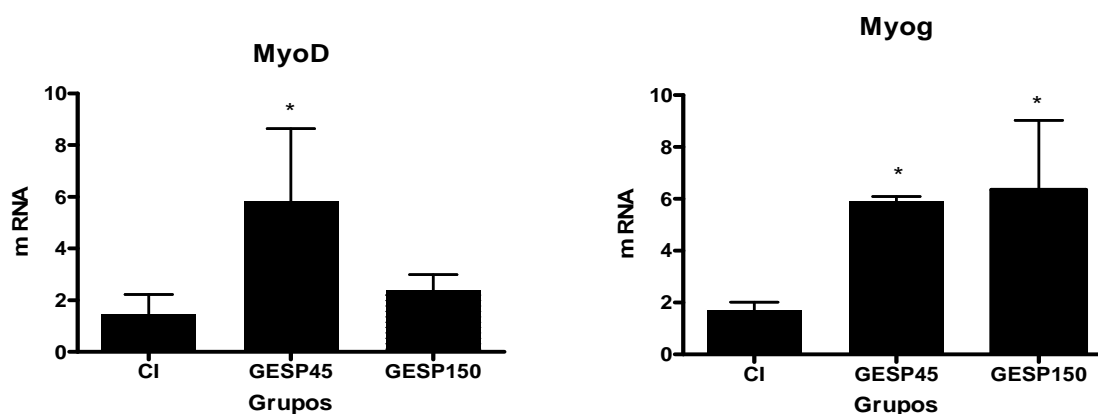


Figura 6 – Expressão de Myod e Miogenina no músculo sóleo de ratos no grupo controle inicial (GCI) e nos grupos com 45 dias (GESP45) de reinervação e 150 dias (GESP150) sem preenchimento de gordura. Amostras de tecido muscular de ratos (*ratus norvegicus*) submetidos ao protocolo cirúrgico de reinervação sem preenchimento de gordura foram coletados. O RNA total extraído e o nível de expressão de Myod e Miogenina foi analisado por RealTimePCR. O resultado apresentado representou o valor da média \pm SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de 16S, obtidos de 4 animais em cada tempo.

4.3 EXPRESSÃO DE MyoD E MIOGENINA EM MÚSCULOS REINERVADOS PELA TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO COM O PREENCHIMENTO DE GORDURA

Nosso próximo objetivo foi caracterizar a cinética de expressão de MyoD e miogenina durante a reinervação do músculo sóleo de ratos nos períodos de 45 e 150 dias usando a técnica de tubulização com o preenchimento com gordura (Figura 7).

Na expressão de MyoD observamos uma cinética parecida, houve um aumento de expressão com significância estatística entre GCI e GEG45 ($p < 0,05$ GCI vs GEG45) e foi constatado um declínio significativo em GEG150 quando comparado a GEG45 ($p < 0,05$ GEG150 vs GEG45). A expressão de Myog 45 dias após a cirurgia de tubulização com o preenchimento de gordura apresentou um aumento de expressão estatisticamente significativo quando comparado com GCI ($p < 0,05$ GEG45 vs GCI). Após 150 dias (GEG 150) da cirurgia de tubulização observamos um declínio significativo na expressão de mRNA quando comparado a GCI e GEG45 ($p < 0,05$ GEG150 vs GEG45 vs GCI).

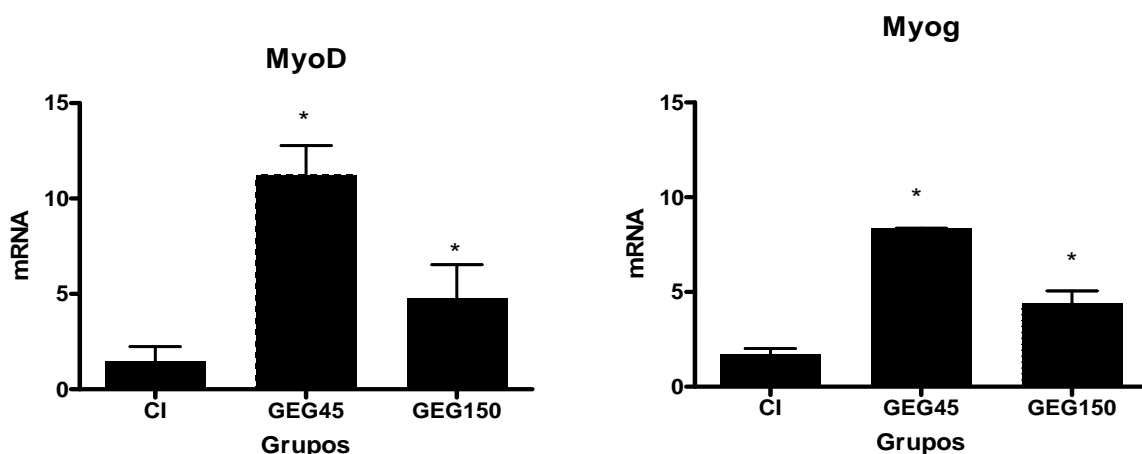


Figura 7 – Expressão de MyoD e Miogenina no músculo sóleo de ratos no grupo controle inicial (GCI) e nos grupos com 45 dias (GEG45) de reinervação e 150 dias (GEG150) com preenchimento de gordura. Amostras de tecido muscular de ratos (*ratus norvegicus*) submetidos ao protocolo cirúrgico de reinervação com preenchimento de gordura foram coletados. O RNA total extraído e o nível de expressão de MyoD e Miogenina foi analisado por RealTimePCR. O resultado apresentado representou o valor da média \pm SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de 16S, obtidos de 4 animais em cada tempo.

4.4 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MyoD E MIOGENINA EM MÚSCULOS REINERVADOS PELA TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO COM E SEM O PREENCHIMENTO DE GORDURA

Nesta etapa comparamos os valores obtidos da expressão de mRNA para Myod e Miogenina entre as duas técnicas cirúrgicas (com preenchimento de gordura e sem preenchimento de gordura) (Figura 8).

Para a expressão de Myod foi constatado uma maior expressão em GEG45 quando comparado a GESP45 com significância estatística ($p < 0,05$ GESP45 vs GEG45). Entre os grupos GEG 150 e GESP150 a diferença também foi significativa ($p < 0,05$ GEG45 vs GESP150) com uma maior expressão para o grupo GEG150. Para a expressão de Miogenina observamos uma maior expressão em GEG45 quando comparado a GESP45 ($p < 0,001$ GEG45 vs GESP45) No entanto, a expressão em GEG150 e GESP150 não mostrou diferença estatística significativa.

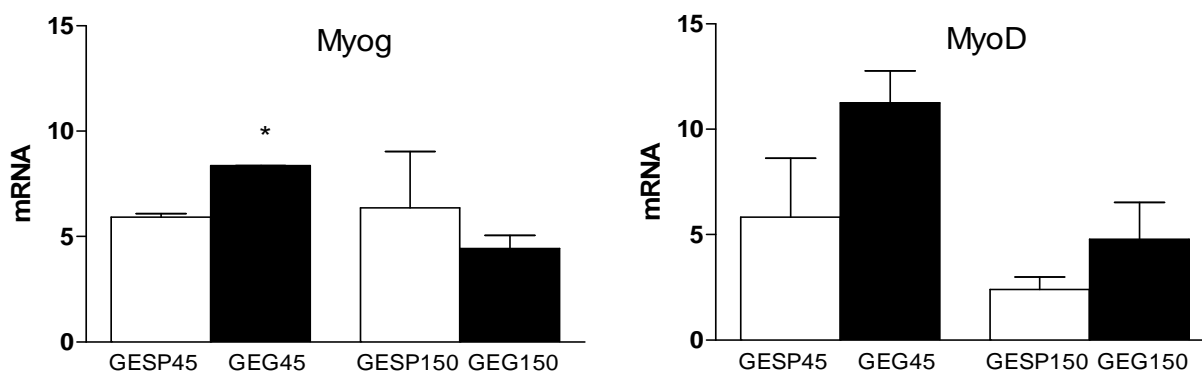


Figura 8 – Comparação de expressão de Myod e Miogenina no músculo sóleo de ratos com 45 (GESP 45), 150 (GESP 150) dias de reinervação sem preenchimento de gordura; com, 45 (GEG45) e 150 (GEG150) dias de reinervação com preenchimento de gordura. Amostras de tecido muscular de ratos (*ratus norvegicus*) submetidos ao protocolo cirúrgico de reinervação sem e com o preenchimento de gordura foram coletadas. O RNA total extraído e o nível de expressão de Myod e Miogenina foi analisado por RealTimePCR. O resultado apresentado representou o valor da média \pm SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de 16S, obtidos de 4 animais em cada grupo.

4.5 LOCALIZAÇÃO DOS FATORES DE REGULAÇÃO MIOGÊNICA MyoD E MIOGENINA POR IMUNOFLORESCÊNCIA

Já conhecendo a expressão dos fatores de regulação miogênica, nosso próximo passo foi a localização espacial de Myod e Miogenina no músculo sóleo de ratos (*ratus norvegicus*) pela técnica de imunofluorescência obtida em microscópio laser confocal (Figura 9). Os núcleos positivos para Myod e Miogenina foram observados no músculo sóleo de ratos do grupo experimental com preenchimento de gordura 45 dias após o protocolo cirúrgico (GEG45). Observamos que Myod e miogenina estão expressos em mionúcleos indicando sua localização espacial.

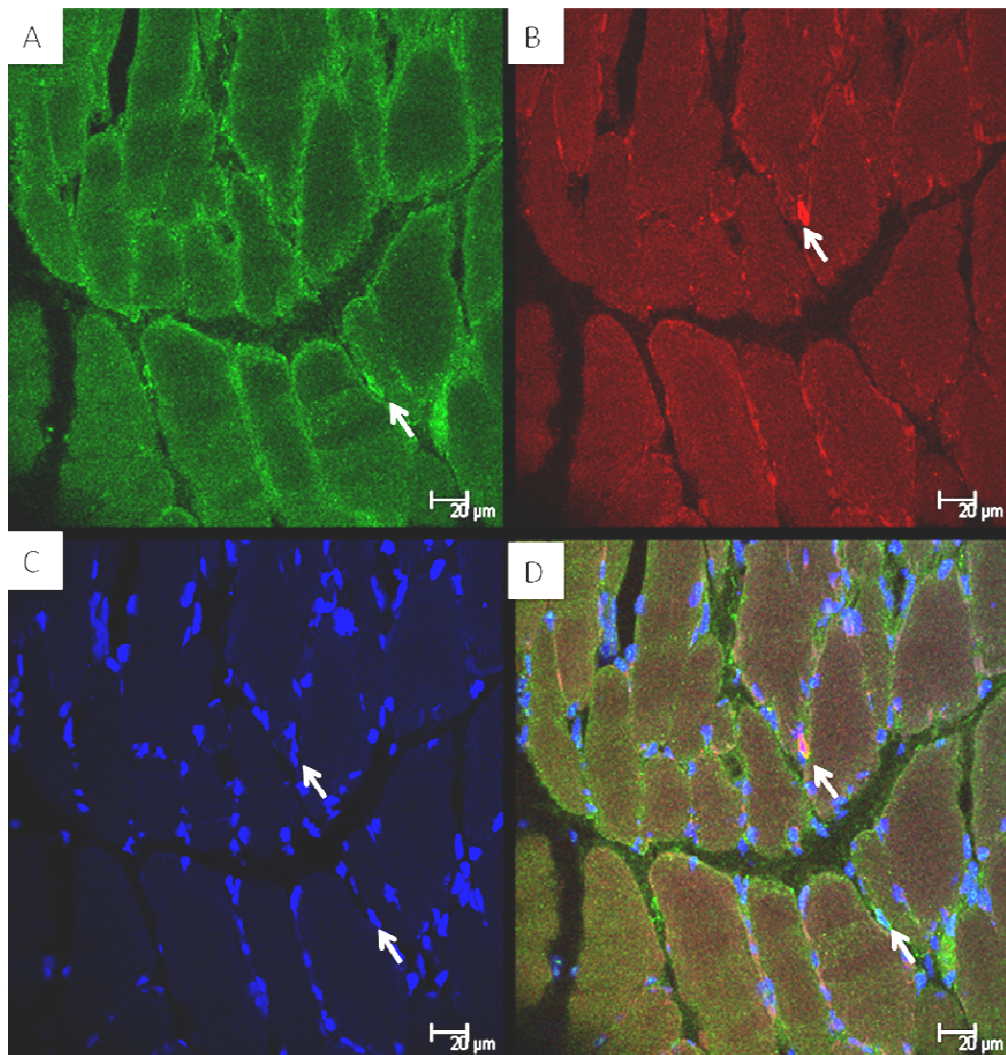


Figura 9 – Fotomicrografia mostrando a localização de Myod e Miogenina. Uma tripla marcação foi realizada para observar a localização de Myod (B), miogenina (A), núcleo (C) e as três imagens sobrepostas (D). As setas em A indicam marcação para Miogenina, B para myod, C os núcleos e em D as três imagens sobrepostas mostrando a localização de Myod e Miogenina.

4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS FIBRAS MUSCULARES

Conhecendo que as fibras musculares são tecidos de alta plasticidade e esta característica é mediada pela influencia dos nervos periféricos, neste momento nosso objetivo foi obter a área média em μm^2 das fibras musculares nos diferentes grupos controles e experimentais para avaliar a eficiência da regeneração nervosa e sua influencia no músculo sóleo dos ratos (Figura 10).

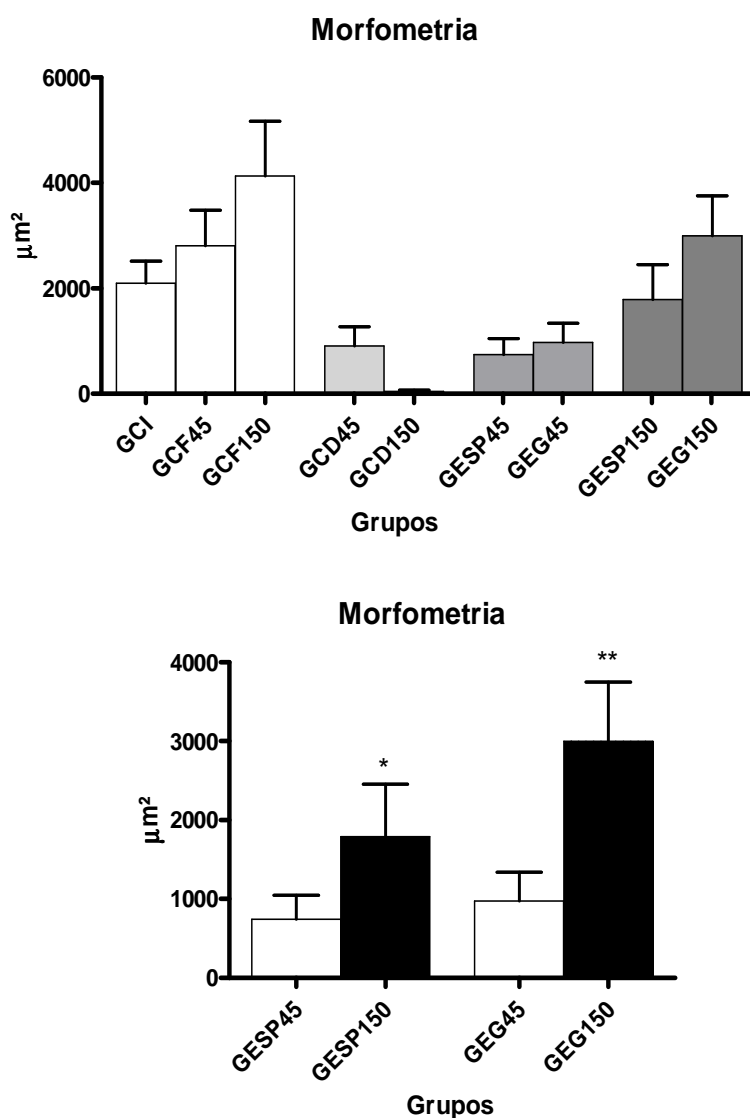


Figura 10 – Morfometria das fibras musculares do músculo sóleo dos grupos inicial (GCI), Grupo final 45 dias (GF45) e 150 dias (GF150); Grupo desnervado 45 dias (GD45) e 150 dias (GCD150); grupos experimentais sem preenchimento de gordura com 45 (GESP45) e 150 dias (GESP150) e Grupos experimentais com preenchimento de gordura com 45 (GEG45) e 150 dias (GEG150). As laminais com os cortes dos músculos de todos os grupos foram analisados pelo programa Image Pro Plus 6.2 O resultado apresentado representou o valor da média \pm SD, da área em μm^2 de 100 fibras musculares, obtidos de 3 animais em cada tempo.

Foi observado um aumento na área média das fibras musculares dos grupos GCI, GF45 e GF150 (GCI 2096 ± 46.92 ; GCF45 2809 ± 57.45 ; GCF150 4134 ± 159.2 $p < 0,05$ GCI vs GCF45 vs GCF150). Dentro dos grupos controles desnervados (GCD45 e GCD150) observamos uma forte redução na área das fibras musculares (GCD45 765.4 ± 23.28 e GCD150 45.81 ± 1.44 $p < 0,05$ GCD45 vs GCD150). Aos 45 dias após a cirurgia de reinervação tanto no grupo GESP como no grupo GEG não observamos diferença estatística significativa (GESP45 742.2 ± 21.79 ; GEG45 976.1 ± 46.24 $p > 0,05$ GESP45 vs GEG45). Contudo, após 150 dias da cirurgia de reinervação uma diferença significativa foi observada entre os grupos GESP150 e GEG150 (GESP150 1788 ± 65.03 ; GEG150 2998 ± 111.0 $p < 0,05$ GESP150 vs GEG150).

Discussão



5 DISCUSSÃO

Atualmente existem vários estudos sobre o tratamento das lesões de nervos periféricos e sua regeneração, porém os seus resultados são controvertidos e não conclusivos. Dentre estes, poucos avaliaram a influência da reinervação nos fatores regulatórios miogênicos, o que motivou a realização do presente estudo.

Dentre os animais usados em pesquisas básicas, o rato é o mais utilizado para o estudo das lesões nervosas periféricas, e a sua interação com o músculo esquelético, pois a estrutura de seus nervos e músculos é semelhante ao dos humanos. (SCHMALBRUCH, 1967).

A escolha dos tempos utilizados nesta pesquisa foi baseada na literatura consultada (BATTISTON et al., 2000; GEUNA et al., 2004) e também de estudos já realizados em nosso laboratório. (BARCELOS et al., 2003; RODRIGUES ADE; SILVA, 2001).

A gordura foi escolhida pela facilidade em se obter o material biológico e por este supostamente atuar como fator trófico para a regeneração axonal. Estudos demonstraram que enxertos derivados do omento maior (tecido rico em adipócitos) obtiveram resultados satisfatórios na recuperação do nervo ciático de ratos. (CASTANEDA; KINNE, 2002). Os enxertos venosos ao avesso também melhoraram a capacidade regenerativa das fibras nervosas, e uma das explicações seria a relação entre a túnica adventícia (rica em adipócitos) do vaso sanguíneo enxertado e a recuperação do nervo ciático em ratos. (FERRARI et al., 1999; RODRIGUES ADE; SILVA, 2001; WANG et al., 1995; WANG et al., 1993).

Os novos conhecimentos produzidos na biologia celular e molecular do músculo esquelético permitem avanços significativos no entendimento dos mecanismos básicos da miogênese. Hoje estão mais esclarecidos os mecanismos responsáveis pela regulação da expressão do programa gênico envolvido na diferenciação de células mesenquimais em mioblastos e destes em miócitos diferenciados. Este conhecimento tem grande importância na prática já que ele elucidou os mecanismos básicos responsáveis pelo reparo e crescimento do tecido muscular.

A recuperação de nervos periféricos e sua possível influência na expressão de genes de regulação miogênica tais como MyoD e Miogenina é um processo complexo e os mecanismos de sinalização que medeiam este processo de reparação, e sua influência no tecido muscular ainda necessitam de maior entendimento.

Os fatores de regulação miogênica (MyoD e Miogenina) podem ser expressos por mionúcleos, células satélites e também por células não musculares que estão presentes no tecido. (ISHIDO; KAMI; MASUHARA, 2004a, 2004b; LEGERLOTZ; SMITH, 2008). Nosso estudo mostra uma nova informação sobre a expressão de fatores de regulação miogênica de músculos em regeneração após reinervação, pois os nossos resultados demonstram que ratos que não sofreram cirurgia, ou seja, os animais dos grupos controles (GCI, GCF45 e GCF150) não sofreram alterações significativas na expressão de fatores regulatórios miogênicos (Figura 5). Sugerindo que tais fatores podem não estar expressos em altas concentrações em músculos adultos normais.

Segundo Jin et al. (2000) esses fatores de regulação miogênica estão envolvidos nas fases iniciais de diferenciação e maturação de células musculares estando portando pouco expressos em músculos já diferenciados. Mas segundo alguns pesquisadores (EFTIMIE; BRENNER; BUONANNO, 1991; HYATT et al., 2003; ISHIDO; KAMI; MASUHARA, 2004a, 2004b; LEGERLOTZ; SMITH, 2008; RUSSO et al., 2007) uma expressão elevada de MyoD e Miogenina pode ser verificada em músculos desnervados. Esta afirmação pode ser comprovada no nosso trabalho, pois ao analisarmos a cinética de expressão de músculos reinervados pela técnica de tubulização sem o preenchimento de gordura observamos um intenso aumento de expressão de MyoD e Miogenina nos grupos com 45 dias de pós-operatório (Figura 6), e ao tempo de 150 dias após cirurgia observamos uma redução da expressão de MyoD caracterizando a resposta do músculo ao estímulo elétrico do nervo regenerado.

Recentes estudos demonstram que a atividade elétrica modula a expressão de fatores regulatórios miogênicos na miogênese da fase adulta, atuando de forma positiva (aumentando a expressão) ou negativa (diminuindo a expressão). (CHARGE et al., 2008; CHARGE; RUDNICKI, 2004; RUSSO et al., 2007). Entretanto, no nosso trabalho, a expressão de Miogenina não mostrou a mesma cinética que MyoD

apresentando um leve aumento de expressão no período de 150 dias pós-operatório. Estes resultados sugerem que o músculo reinervado sem o preenchimento de gordura está em uma fase de diferenciação e fusão de miócitos, pois, está bem estabelecido na literatura que a Miogenina regula a diferenciação muscular e a fusão de miócitos em músculos no embrião e na fase adulta. (MEADOWS et al., 2008).

Após observamos que a reinervação pela técnica de tubulização promoveu uma modulação nos fatores de regulação miogênica, passamos para a etapa seguinte, que foi a de estudar o papel desses fatores regulatórios miogênicos frente a novos desafios. A gordura “in natura” como preenchimento do enxerto venoso foi introduzida e comparamos os eventos celulares nos tempos de 45 e 150 dias após reinervação com o preenchimento de gordura.

Os animais reinervados pela técnica de tubulização com o preenchimento de gordura apresentaram um intenso aumento de expressão de MyoD e Miogenina nos grupos com 45 dias de pós-operatório (Figura 7). De acordo com tais resultados, uma expressão elevada de MyoD e Miogenina pode ser verificada em músculos desnervados assim como descrito anteriormente.

Como previamente demonstrado, nos animais grupo sem preenchimento de gordura, ao tempo de 150 dias após cirurgia observamos uma redução da expressão de MyoD caracterizando a resposta do músculo ao estímulo elétrico do nervo regenerado modulando a expressão de MyoD (Figura 7). Tal padrão de resposta também foi encontrado para a Miogenina no grupo 150 dias pós-operatório, e diferente do que foi visto no grupo sem preenchimento de gordura, a miogenina apresentou uma queda na expressão no grupo 150 dias quando comparado ao grupo 45 dias. Este fato caracteriza uma fase de diferenciação e fusão de miócitos mais avançada, pois a Miogenina também apresenta uma atividade regulada por estímulos elétricos provenientes do nervo em regeneração. (EFTIMIE; BRENNER; BUONANNO, 1991; HYATT et al., 2003; MEADOWS et al., 2008). Além disso, o decréscimo da expressão de miogenina seguida da reinervação é mais lento que o aumento de expressão seguido pela desnervação, indicando dois padrões distintos para a regulação gênica da miogenina, um para reinervação outro para desnervação. (BLAGDEN; FROMM; BURDEN, 2004).

Esses dados mostram que tanto a MyoD como a Miogenina, estão respondendo a atividade elétrica do nervo em regeneração tanto no grupo sem preenchimento de gordura como no grupo com preenchimento de gordura. Porém a atividade destes fatores regulatórios miogênicos (MyoD e Miogenina) são um evento complexo, onde diversas moléculas presentes no micro-meio podem participar modulando a expressão desses genes. Vale ainda destacar que a avaliação realizada nesse estudo foi de mRNA e que estes valores não representam precisamente os níveis de proteína funcional, já que o mRNA de MyoD e Miogenina podem sofrer alterações pós transcricionais. (LAUNAY et al., 2001).

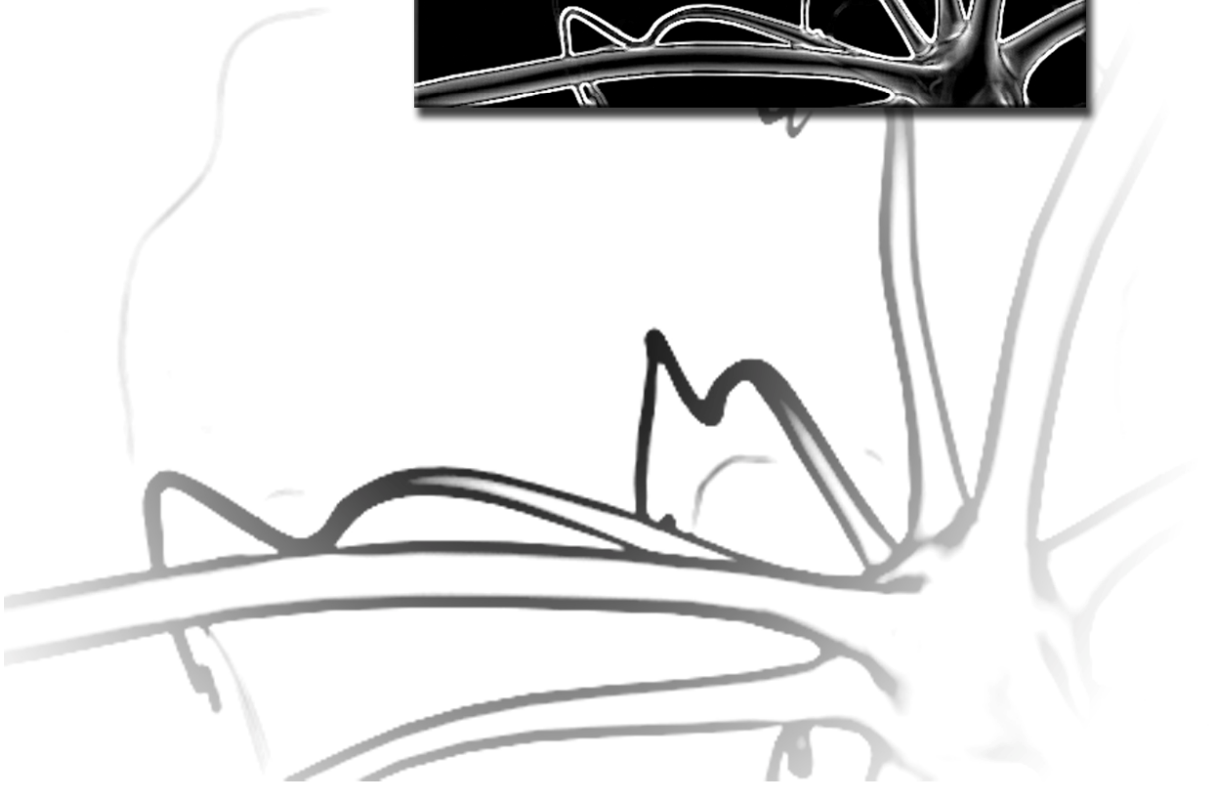
Após observarmos a influência da reinervação na modulação da expressão de MyoD e Miogenina, passamos ao estudo da área da secção transversa das fibras musculares de todos os grupos controle e experimentais.

Na análise da área da secção transversa nos animais dos grupos controle inicial, final 45 e final 150 há um aumento linear na área da fibra resultado do desenvolvimento natural do animal. Entretanto, nos animais dos grupos controle desnervados 45 e 150 dias observamos uma diminuição na área da secção transversa provando a ausência de estímulo elétrico proveniente do nervo. (fig.10) Resultados semelhantes aos encontrados na literatura mostrando uma redução na área das fibras musculares. (HYATT et al., 2003; ZHANG, D. et al., 2006). Nos grupos experimentais com 45 dias pós-operatórios tanto para o grupo sem preenchimento de gordura e com preenchimento de gordura encontramos resultados semelhantes quando comparados ao grupo desnervado 45 dias sugerindo que estes grupos ainda não sofreram alterações provenientes da regeneração do nervo. Os animais dos grupos experimentais com 150 dias pós-operatórios, apresentaram um aumento significativo na área da secção transversal quando comparados aos grupos com 45 dias de reinervação. Além disso, a diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos 150 dias sem preenchimento de gordura ao compararmos com o grupo de 150 dias com o preenchimento de gordura.

Assim, apesar do uso da gordura “in natura” no preenchimento de veias para regeneração nervosa ter mostrado uma boa influência sobre o desenvolvimento no músculo reinervado, não pode ser esquecido que muitas variáveis estão presentes nesses fenômenos e que vários estudos ainda necessitam ser realizados para otimizar este fenômeno biológico. Assim, podemos pensar em novas técnicas

cirúrgicas, ou novos meio de união entre os nervos seccionados, mas elas devem ser focadas também na modulação de fatores que alteram a regeneração nervosa e muscular, resultando assim em um efeito potencialmente mais amplo.

Dentro deste raciocínio fica a seguinte pergunta “Como seria o resultado da influência da gordura “in natura” sobre a regeneração muscular usando-se outros tubos, ao invés da veia, na técnica de tubulização? As gorduras retiradas de vários locais do corpo teriam os mesmos resultados? Poderia ser associado fatores de crescimento à gordura “in natura.

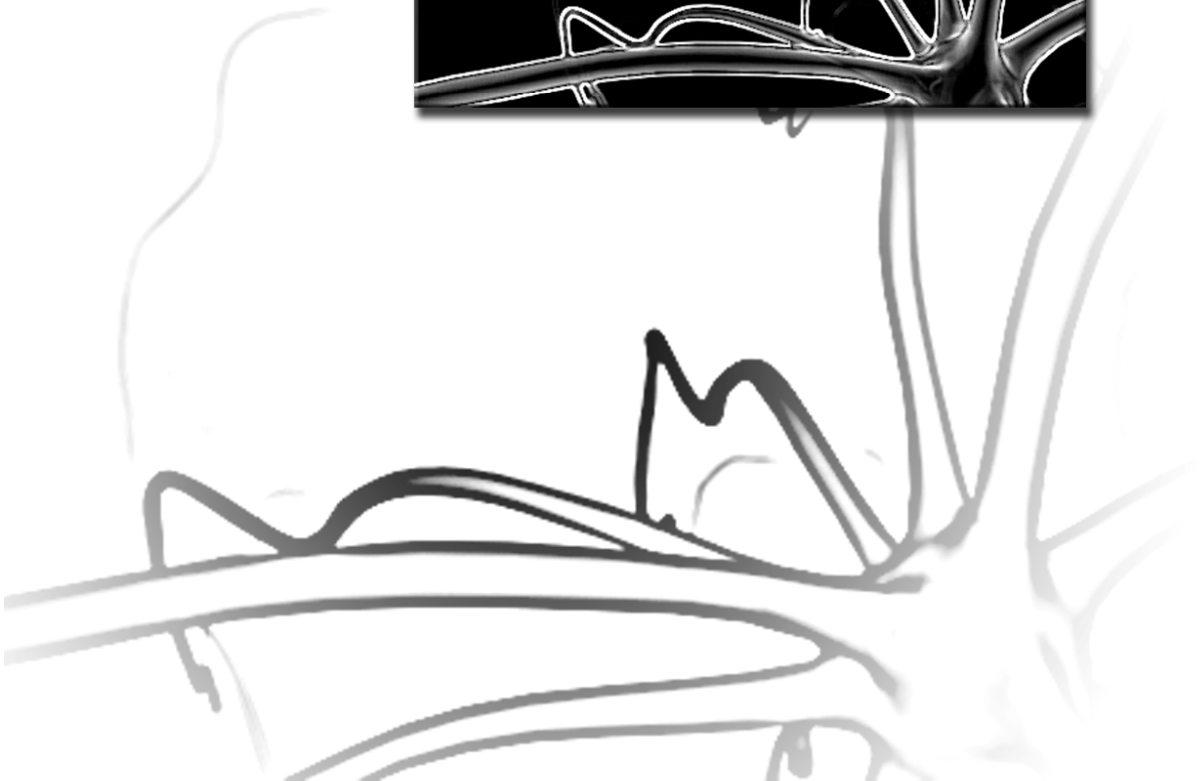


6 CONCLUSÃO

Baseado nos dados encontrados neste trabalho podemos concluir que:

- 1) O uso da gordura na técnica de tubulização do nervo ciático de ratos, interfere na regeneração do músculo sóleos.
- 2) Que esta interferência ocorre da seguinte maneira:
 - a) Diminuição da expressão de fatores regulatórios miogênicos mostrando a influência da atividade elétrica sobre esses fatores.
 - b) Aumento na área da secção transversa foi maior nos animais do grupo reinervado pela técnica de tubulização com o preenchimento de gordura.

Referências



REFERÊNCIAS

Amthor H, Christ B, Patel K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development*. 1999;126(5):1041-53.

Bailey P, Holowacz T, Lassar AB. The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(6):679-89.

Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD, Padovani CR. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery*. 2003;23(1):66-71.

Battiston B, Tos P, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG, Guglielmone R. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. II. Morphological analysis of regeneration. *Microsurgery*. 2000;20(1):37-41.

Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(4-5):585-95.

Blagden CS, Fromm L, Burden SJ. Accelerated response of the myogenin gene to denervation in mutant mice lacking phosphorylation of myogenin at threonine 87. *Mol Cell Biol*. 2004;24(5):1983-9.

Borisov AB, Carlson BM. Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. *Anat Rec*. 2000;258(3):305-18.

Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat Rec*. 2001;264(2):203-18.

Borisov AB, Huang SK, Carlson BM. Remodeling of the vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. *Anat Rec*. 2000;258(3):292-304.

Bryson-Richardson RJ, Currie PD. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet*. 2008;9(8):632-46.

Caiozzo VJ. Plasticity of skeletal muscle phenotype: mechanical consequences. *Muscle Nerve*. 2002;26(6):740-68.

Castaneda F, Kinne RK. Omental graft improves functional recovery of transected peripheral nerve. *Muscle Nerve*. 2002;26(4):527-32.

Charge SB, Brack AS, Bayol SA, Hughes SM. MyoD- and nerve-dependent maintenance of MyoD expression in mature muscle fibres acts through the DRR/PRR element. *BMC Dev Biol*. 2008;8:5.

Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84(1):209-38.

Craig C. The structure of the contractile filaments. In: Engel AG, editor. *Myology*. New York: McGraw-Hill; 1994. p. 134-75.

D'Andrea F, De Francesco F, Ferraro GA, Desiderio V, Tirino V, De Rosa A, et al. Large-Scale Production of Human Adipose Tissue from Stem Cells: A New Tool for Regenerative Medicine and Tissue Banking. *Tissue Eng Part A*. 2008.

Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB, Carlson BM. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. *Anat Rec*. 2001;263(2):139-54.

Deschenes MR, Maresh CM, Kraemer WJ. Exercise training of moderate intensity does not abate the effects of denervation on muscle morphology. *Int J Sports Med*. 1997;18(6):426-30.

Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(4):1349-53.

Fawcett JW, Keynes RJ. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. *J Neurosurg*. 1986;65(3):354-63.

Ferrari F, De Castro Rodrigues A, Malvezzi CK, Dal Pai Silva M, Padovani CR. Inside-out vs. standard vein graft to repair a sensory nerve in rats. *Anat Rec*. 1999;256(3):227-32.

Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol.* 1989;33(2):87-134.

Geuna S, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Bridging peripheral nerve defects with muscle-vein combined guides. *Neurol Res.* 2004;26(2):139-44.

Goulding M, Lumsden A, Paquette AJ. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development.* 1994;120(4):957-71.

Gutmann E. [Denervation-and inactivity atrophy of skeletal musculature]. *Arztl Forsch.* 1969;23(2):33-41.

Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature.* 1993;364(6437):501-6.

Heijke GC, Klopper PJ, Dutrieux RP. Vein graft conduits versus conventional suturing in peripheral nerve reconstructions. *Microsurgery.* 1993;14(9):584-8.

Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR. Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(5):C1161-73.

Irintchev A, Wernig A. Denervation and reinnervation of muscle: physiological effects. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1994:S28-30.

Ishido M, Kami K, Masuhara M. In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004a;287(2):C484-93.

Ishido M, Kami K, Masuhara M. Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles. *Acta Physiol Scand.* 2004b;180(3):281-9.

Ishihara A, Roy RR, Ohira Y, Iyata Y, Edgerton VR. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. *J Appl Physiol.* 1998;84(6):2183-9.

Itoh S, Shinomiya K, Samejima H, Ohta T, Ishizuki M, Ichinose S. Experimental study on nerve regeneration through the basement membrane tubes of the nerve, muscle, and artery. *Microsurgery*. 1996;17(10):525-34.

Jin Y, Murakami N, Saito Y, Goto Y, Koishi K, Nonaka I. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, mdx and dy, during regeneration. *Acta Neuropathol*. 2000;99(6):619-27.

Kablar B, Asakura A, Krastel K, Ying C, May LL, Goldhamer DJ, et al. MyoD and Myf-5 define the specification of musculature of distinct embryonic origin. *Biochem Cell Biol*. 1998;76(6):1079-91.

Lander AD, Fujii DK, Reichardt LF. Laminin is associated with the "neurite outgrowth-promoting factors" found in conditioned media. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(7):2183-7.

Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, et al. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell*. 1991;66(2):305-15.

Launay T, Armand AS, Charbonnier F, Mira JC, Donsez E, Gallien CL, et al. Expression and neural control of myogenic regulatory factor genes during regeneration of mouse soleus. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(7):887-99.

Legerlotz K, Smith HK. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. *Muscle Nerve*. 2008;38(3):1087-100.

Ma PC, Rould MA, Weintraub H, Pabo CO. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*. 1994;77(3):451-9.

Meadows E, Cho JH, Flynn JM, Klein WH. Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Dev Biol*. 2008;322(2):406-14.

Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol*. 1995;73(9-10):723-32.

Millesi H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve grafting. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1982a;19:25-37.

- Millesi H. Microsurgery of peripheral nerves. *Ann Chir Gynaecol.* 1982b;71(1):56-64.
- Molkentin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell.* 1995;83(7):1125-36.
- Murray MA, Robbins N. Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells. *Neuroscience.* 1982a;7(7):1823-33.
- Murray MA, Robbins N. Cell proliferation in denervated muscle: time course, distribution and relation to disuse. *Neuroscience.* 1982b;7(7):1817-22.
- Murre C. Role of helix-loop-helix proteins in lymphocyte development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1999;64:39-44.
- Niemela SM, Miettinen S, Konttinen Y, Waris T, Kellomaki M, Ashammakhi NA, et al. Fat tissue: views on reconstruction and exploitation. *J Craniofac Surg.* 2007;18(2):325-35.
- Palmer S, Groves N, Schindeler A, Yeoh T, Biben C, Wang CC, et al. The small muscle-specific protein Csl modifies cell shape and promotes myocyte fusion in an insulin-like growth factor 1-dependent manner. *J Cell Biol.* 2001;153(5):985-98.
- Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet.* 2003;4(7):497-507.
- Patapoutian A, Yoon JK, Miner JH, Wang S, Stark K, Wold B. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development.* 1995;121(10):3347-58.
- Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP, Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:747-83.
- Rawls A, Morris JH, Rudnicki M, Braun T, Arnold HH, Klein WH, et al. Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. *Dev Biol.* 1995;172(1):37-50.
- Rodrigues Ade C, Silva MD. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. *Microsurgery.* 2001;21(3):102-7.

Rosser BW, Dean MS, Bandman E. Myonuclear domain size varies along the lengths of maturing skeletal muscle fibers. *Int J Dev Biol.* 2002;46(5):747-54.

Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell.* 1993;75(7):1351-9.

Russo TL, Peviani SM, Freria CM, Gigo-Benato D, Geuna S, Salvini TF. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogen-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve.* 2007;35(1):87-97.

Schmalbruch H. [Types of fibers in the leg musculature of the mouse]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1967;79(1):64-75.

Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve.* 2000;23(4):617-26.

Seale P, Asakura A, Rudnicki MA. The potential of muscle stem cells. *Dev Cell.* 2001;1(3):333-42.

Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* 2000;102(6):777-86.

Summerbell D, Ashby PR, Coutelle O, Cox D, Yee S, Rigby PW. The expression of Myf5 in the developing mouse embryo is controlled by discrete and dispersed enhancers specific for particular populations of skeletal muscle precursors. *Development.* 2000;127(17):3745-57.

Summerbell D, Rigby PW. Transcriptional regulation during somitogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2000;48:301-18.

Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg.* 1975;56(2):166-70.

Valentini RF, Aebischer P, Winn SR, Galletti PM. Collagen- and laminin-containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. *Exp Neurol.* 1987;98(2):350-6.

Viguie CA, Lu DX, Huang SK, Rengen H, Carlson BM. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. *Anat Rec.* 1997;248(3):346-54.

Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF, Konieczny SF. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. *Dev Dyn.* 1993;198(3):214-24.

Walters EH, Stickland NC, Loughna PT. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil.* 2000;21(7):647-53.

Walton RL, Brown RE, Matory WE, Jr., Borah GL, Dolph JL. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84(6):944-9; discussion 50-2.

Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Eby PL, Seckel BR. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. *Microsurgery.* 1995;16(2):65-70.

Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Jones DS, Seckel BR. Inside-out vein graft promotes improved nerve regeneration in rats. *Microsurgery.* 1993;14(9):608-18.

Williams BA, Ordahl CP. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development.* 1994;120(4):785-96.

Woledge RC. Possible effects of fatigue on muscle efficiency. *Acta Physiol Scand.* 1998;162(3):267-73.

Yoon JK, Olson EN, Arnold HH, Wold BJ. Different MRF4 knockout alleles differentially disrupt Myf-5 expression: cis-regulatory interactions at the MRF4/Myf-5 locus. *Dev Biol.* 1997;188(2):349-62.

Yoshimura K, Asato H, Cederna PS, Urbanek MG, Kuzon WM. The effect of reinnervation on force production and power output in skeletal muscle. *J Surg Res.* 1999;81(2):201-8.

Yoshitani M, Fukuda S, Itoi S, Morino S, Tao H, Nakada A, et al. Experimental repair of phrenic nerve using a polyglycolic acid and collagen tube. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133(3):726-32.

Zhang D, Liu M, Ding F, Gu X. Expression of myostatin RNA transcript and protein in gastrocnemius muscle of rats after sciatic nerve resection. *J Muscle Res Cell Motil.* 2006;27(1):37-44.

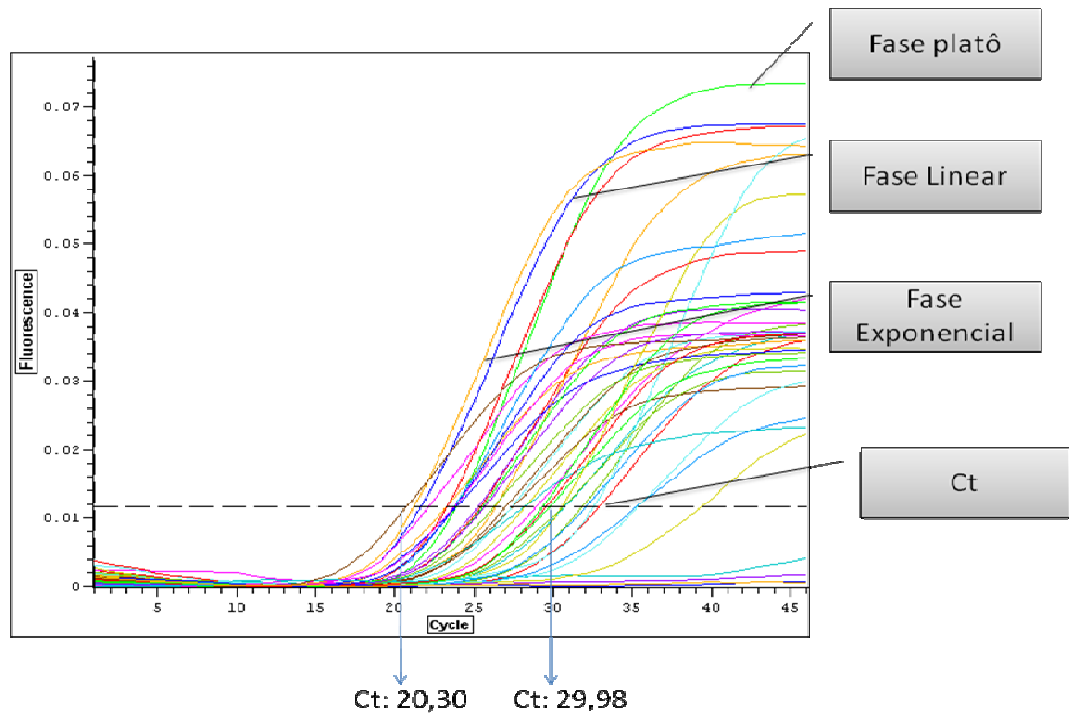
Zhang W, Behringer RR, Olson EN. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev.* 1995;9(11):1388-99.

Apêndices



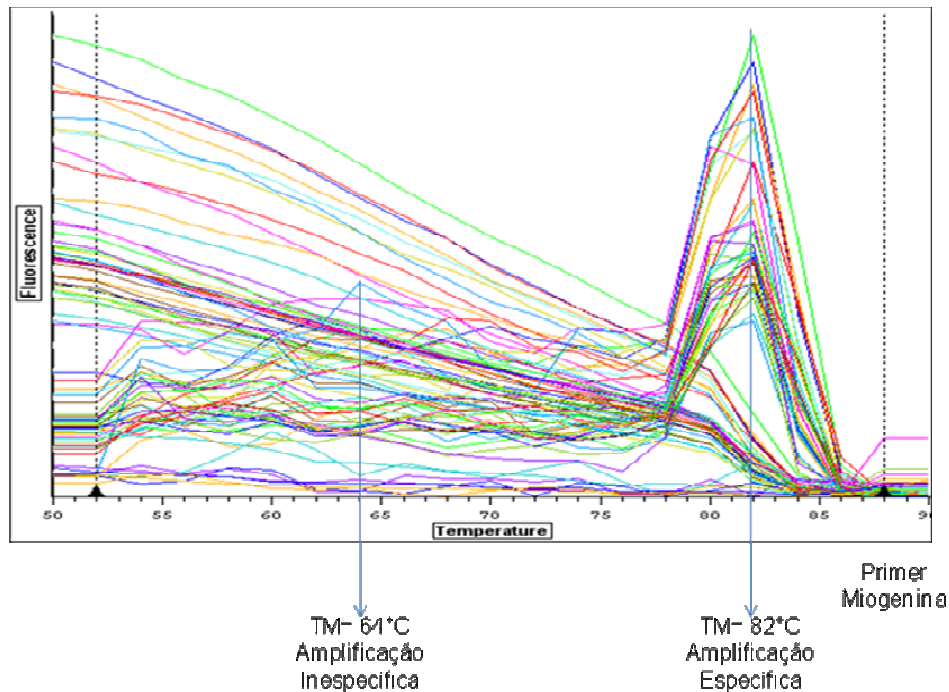
APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR



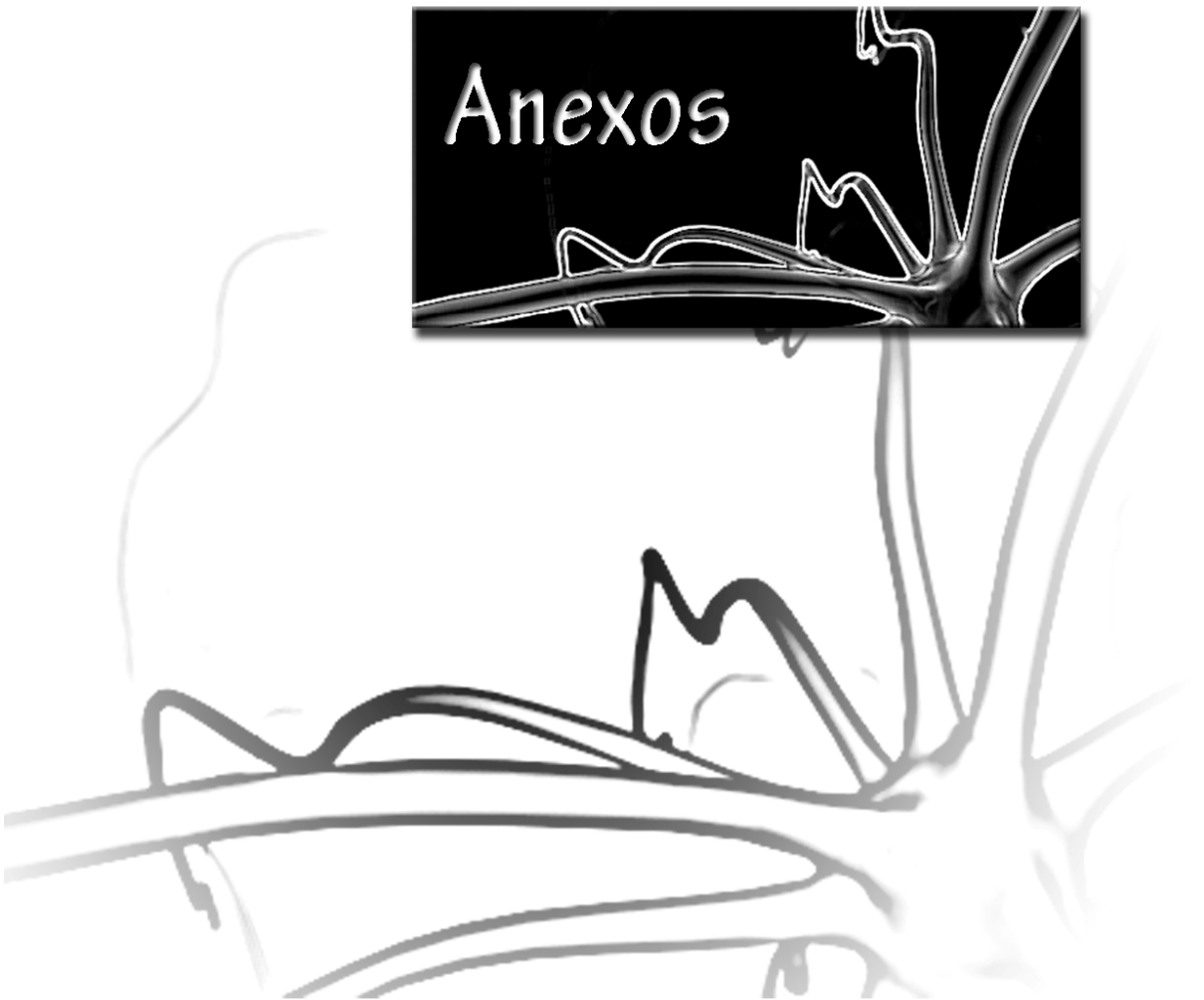
O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras (o termociclador ABI5700, associado ao Software ABI Prism, Applied Biosystems) através da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação nucleases fluorogênicas (SYBRGreen 1) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras, atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. A figura demonstra os resultados obtidos para a amplificação de 48 amostras e de um controle negativo; exemplificando as fases de amplificação, a determinação de Ct, assim como os valores de Ct de cada uma das amostras

APÊNDICE B – Análise da curva de dissociação para determinação da especificidade da reação de amplificação através de RealTimePCR



A especificidade da reação de amplificação foi analisada através da curva de dissociação, comparando os picos obtidos da dissociação do produto amplificado à temperatura de Melting (TM) do fragmento de amplificação esperado (nesse exemplo, TM Miogenina=82°C). A figura demonstra os resultados obtidos pela dissociação de 48 amostras nas quais a mesma concentração de primers (sense e antisense) para Miogenina foi utilizada (0,5µM; todas com a mesma concentração de cDNA, de uma mesma amostra), e de um controle negativo (0,5µM + água). Podemos observar a gradativa redução dos produtos inespecíficos (identificados como os picos na temperatura de 64°C), e a detecção do produto específico (identificado pelo pico na temperatura de 82°C).

Anexos



ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética e pesquisa

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

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

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

CEEPA-Proc. N° 19/2007

Bauru 17 de setembro de 2007.

Senhor Professor,

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

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

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais

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

ANEXO B – Modificação aprovada pelo comitê de ética e pesquisa**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

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

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

Of. CEEPA-FOB/USP Nº 02/2009

Proc. Nº 019/2007

Bauru, 27 de fevereiro de 2009.

Senhor Professor,

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

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

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

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

Atenciosamente,

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

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