

Ação da vanilina (*Vanilla planifolia*) sobre a morfologia dos músculos tibial anterior e sóleo após lesão nervosa

Action of vanillin (*Vanilla planifolia*) on the morphology of tibialis anterior and soleus muscles after nerve injury

Ana Luiza Peretti¹, Juliana Sobral Antunes¹, Keli Lovison¹, Regina Inês Kunz¹, Lidyane Regina Gomes Castor¹, Rose Meire Costa Brancalhão¹, Gladson Ricardo Flor Bertolini¹, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar a ação da vanilina (*Vanilla planifolia*) sobre a morfologia dos músculos tibial anterior e sóleo após lesão nervosa periférica. **Métodos:** Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos, com sete animais cada, sendo Grupo Controle, Grupo Vanilina, Grupo Lesão e Grupo Lesão + Vanilina. Os animais dos Grupos Lesão e Grupo Lesão + Vanilina foram submetidos à lesão nervosa por meio da compressão do nervo isquiático, e os Grupos Vanilina e Grupo Lesão + Vanilina foram tratados diariamente com doses orais de vanilina (150mg/kg) do 3º ao 21º dia após a indução da lesão nervosa. Ao término do experimento, os músculos tibial anterior e sóleo foram dissecados e seguiram o processamento de rotina em microscopia de luz, para posterior análise morfológica. **Resultados:** A compressão nervosa promoveu alterações morfológicas características de denervação, sendo que o tratamento com vanilina foi responsável por respostas distintas nos músculos estudados. Para o tibial anterior, houve aumento do número de células satélites, núcleos centrais e atrofia das fibras, bem como desorganização fascicular. Já no sóleo, houve apenas aumento da vascularização, sem exacerbação das alterações morfológicas nas fibras. **Conclusão:** O tratamento com vanilina promoveu o aumento da vascularização intramuscular para os músculos estudados, com potencial pró-inflamatório para o tibial anterior, o que não ocorreu no músculo sóleo.

Descritores: Músculo esquelético; Denervação muscular; Traumatismos dos nervos periféricos; Reabilitação; Produtos biológicos

ABSTRACT

Objective: To evaluate the action of vanillin (*Vanilla planifolia*) on the morphology of tibialis anterior and soleus muscles after peripheral nerve injury. **Methods:** Wistar rats were divided into four groups, with seven animals each: Control Group, Vanillin Group, Injury Group,

and Injury + Vanillin Group. The Injury Group and the Injury + Vanillin Group animals were submitted to nerve injury by compression of the sciatic nerve; the Vanillin Group and Injury + Vanillin Group, were treated daily with oral doses of vanillin (150mg/kg) from the 3rd to the 21st day after induction of nerve injury. At the end of the experiment, the tibialis anterior and soleus muscles were dissected and processed for light microscopy and submitted to morphological analysis. **Results:** The nerve compression promoted morphological changes, typical of denervation, and the treatment with vanillin was responsible for different responses in the studied muscles. For the tibialis anterior, there was an increase in the number of satellite cells, central nuclei and fiber atrophy, as well as fascicular disorganization. In the soleus, only increased vascularization was observed, with no exacerbation of the morphological alterations in the fibers. **Conclusion:** The treatment with vanillin promoted increase in intramuscular vascularization for the muscles studied, with pro-inflammatory potential for tibialis anterior, but not for soleus muscle.

Keywords: Muscle, skeletal; Muscle denervation; Peripheral nerve injuries; Rehabilitation; Biological products

INTRODUÇÃO

As lesões nervosas periféricas (LNP) ocorrem mundialmente e podem gerar alterações físicas e funcionais, comumente associadas a quadros algícos e sequelas, bem como causar impactos socioeconômicos.^(1,2) Destacam-se, como principais fatores etiológicos deste tipo de lesão, os acidentes automotivos, os traumas por arma de fogo e arma branca, as quedas e a compressão ou esmagamento do tecido nervoso, sendo o nervo isquiático o mais frequentemente afetado nas LNP dos membros inferiores.^(1,3)

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil.

Autor correspondente: Regina Inês Kunz – Rua Universitária, 2.069 – CEP: 85819-110 – Cascavel, PR, Brasil – Tel.: (45) 3220-7405 – E-mail: regina_kunz@hotmail.com

Data de submissão: 15/12/2016 – Data de aceite: 12/4/2017

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082017AO3967

Nas lesões completas, a interrupção da comunicação neuromuscular provoca a perda imediata da atividade voluntária reflexa do músculo, alterando a excitabilidade da membrana, diminuindo seu potencial de repouso e tornando as fibras musculares hipersensíveis à acetilcolina.⁽⁴⁾ Também podem ocorrer diminuição da força e alterações morfológicas, como a atrofia, degeneração e necrose, além da substituição por tecido conjuntivo fibroso.^(5,6)

Dentre os tratamentos disponíveis para as disfunções nervosas e musculoesqueléticas, destacam-se os realizados de forma multidisciplinar, considerando a eliminação dos fatores de risco, englobando a fisioterapia, a terapia medicamentosa e a cirurgia, a qual está indicada somente nos casos de comprometimento neurológico grave, dor significativa ou falência completa do tratamento clínico.⁽⁷⁾ Por resultar em dores muitas vezes incapacitantes, os tratamentos das LNP quase sempre estão vinculados ao uso de algum tipo de medicamento, principalmente analgésicos e anti-inflamatórios.⁽⁸⁾

O uso de medicamentos, na maioria das vezes, é eficaz para aliviar o quadro algíco rapidamente, porém, sempre há risco de reações adversas. Neste sentido, a busca por novos fármacos é imprescindível, e entre eles, os produtos naturais com potencial efeito analgésico e menores efeitos colaterais vêm sendo pesquisados.⁽⁸⁾ Partindo desta premissa, a vanilina, composto químico oriundo da vagem da (*Vanilla planifolia*), uma orquídea tropical, tem sido estudada experimentalmente no tratamento da dor neuropática, alodínia e edema, com efeitos positivos em compressões nervosas para o tratamento dos sintomas da doença.^(9,10)

Apesar de seu uso, não há consenso na literatura sobre a ação da vanilina nas LNP. Além disso, uma vez que os sistemas neural e musculoesquelético estão intimamente relacionados, a conduta terapêutica deve contemplar não somente os cuidados com o nervo, mas também com o músculo inervado.

OBJETIVO

Avaliar a ação da vanilina (*Vanilla planifolia*) sobre a morfologia dos músculos tibial anterior e sóleo após lesão nervosa periférica.

MÉTODOS

Estudo realizado no Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Todos os procedimentos adotados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal da universidade, seguindo normas internacionais para experimentação animal.

Grupo amostral

O cálculo do tamanho amostral utilizado no presente estudo baseou-se na experiência dos pesquisadores em estudos desta natureza, bem como em dados descritos na literatura, referentes aos efeitos experimentais da vanilina.^(9,10)

Foram utilizados 28 ratos machos da linhagem Wistar, com média de idade de 10 semanas e peso de 350g, mantidos em caixas padrão de polipropileno, em ambiente com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, composto por sete ratos cada, sendo: Grupo Controle (GC), composto por animais que não sofreram nenhuma intervenção; Grupo Vanilina (GV), composto por animais sem compressão nervosa, mas tratados com vanilina; Grupo Lesão (GL), com animais submetidos à compressão do nervo isquiático, mas sem terapia; e Grupo Lesão + Vanilina (GLV), com animais submetidos à compressão do nervo isquiático e tratados com vanilina.

Protocolo de lesão

Para a realização da compressão do nervo isquiático, os animais foram previamente pesados e anestesiados com cloridrato de cetamina (50mL/kg) e xilazina (10mL/kg). Após a tricotomia do membro pélvico direito e assepsia da região com álcool 70%, foi realizada a incisão paralela às fibras do músculo bíceps femoral, expondo o nervo isquiático, que foi comprimido com auxílio de pinça hemostática durante 30 segundos. A pressão de pinçamento foi padronizada para todos os animais e realizada sempre pelo mesmo pesquisador, utilizando-se como referência o segundo dente da cremalheira.⁽³⁾ Por fim, efetuou-se a sutura por planos e aplicação de iodo sobre a incisão.

Protocolo de administração da vanilina

A partir do 3º dia de pós-operatório (PO), iniciou-se a administração da vanilina para o GV e o GLV. Os animais destes grupos receberam doses orais diárias de 150mg/kg de vanilina, por meio de gavagem, até o 21º PO.

Análise morfológica

No 22º dia de experimento, os animais de todos os grupos foram pesados, anestesiados e eutanasiados por decapitação em guilhotina. Os músculos tibial anterior e sóleo direitos foram dissecados, fixados em solução de Metacarn por 24 horas e armazenados em álcool 70%. Posteriormente, os músculos passaram pelo processamento histológico de rotina, para inclusão em parafina,

e coloração em hematoxilina e eosina e em tricrômico de Mallory.

O laminário obtido foi analisado em microscópio de luz e fotomicrografado. Foram obtidas aleatoriamente dez imagens de cada músculo estudado, sendo mensuradas com fibras musculares quanto ao menor diâmetro e área da fibra, por meio do programa Image Pro-Plus 6.0. A análise do tecido conjuntivo, endomísio e perimísio foi realizada por meio da percentagem de *pixels* pelo programa GIMP 2.0.

Análise dos resultados

A normalidade dos dados foi constatada pelo teste de Shapiro-Wilk, que posteriormente foi comparada pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) unidirecional, com pós-teste de Tukey pelo programa Graph Pad Prism 6.0. Para todas as análises, foi considerado $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Na análise do músculo tibial anterior (Figura 1A) e sóleo (Figura 2A) dos animais do GC, foi verificado

aspecto normal, com as fibras organizadas em padrão fascicular e individualmente em formato poligonal e multinucleadas, cujos núcleos se situavam na periferia, junto à membrana sarcoplasmática. A mesma morfologia foi visualizada no músculo tibial anterior (Figura 1B) dos animais do GV, que não sofreram lesão e foram tratados com vanilina. No músculo sóleo dos animais deste grupo, também houve normalidade no aspecto das fibras musculares, mas foi observado aumento na vascularização, marcada tanto por vasos sanguíneos dilatados quanto túrgidos (Figura 2B).

Já no GL, as fibras musculares, tanto do tibial anterior (Figura 1C) quanto do sóleo (Figuras 2C), apresentavam-se com alterações características resultantes da compressão nervosa. Nestes animais, foi constatada acentuada desorganização fascicular e alteração no tamanho das fibras, denotando atrofia, além de algumas com perda do formato poligonal característico. Fibras musculares em processo degenerativo avançado foram pontualmente notadas, embora a maioria se mostrou com núcleos hipertroficados localizados no centro ou na periferia, acompanhados ou não de halo basofílico, bem como núcleos aglomerados e enfileirados na periferia da fibra – região eventualmente acompanhada por mudanças de coloração.

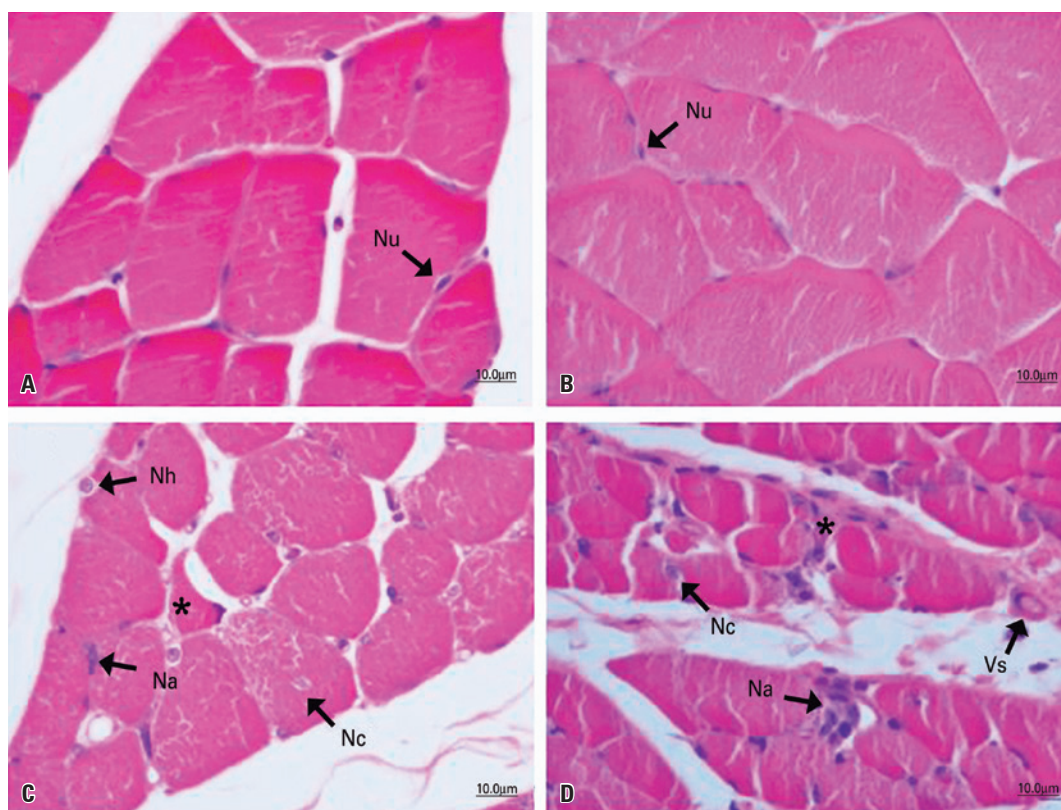


Figura 1. Fotomicrografias do músculo tibial anterior de ratos Wistar, corte transversal, coloração em hematoxilina e eosina. Grupo Controle (A), Grupo Vanilina (B), Grupo Lesão (C) e Grupo Lesão + Vanilina (D). Em A e B, organização fascicular com fibras poligonais e núcleos (Nu) periféricos. Em C, fibras musculares polimórficas (*), núcleos hipertroficados (Nh), centrais (Nc) ou aglomerados (Na) na periferia da fibra. Em D, fibra polimórfica (*), núcleos centrais (Nc) e aglomerados (Na) na periferia da fibra, e vasos sanguíneos (Vs) dilatados

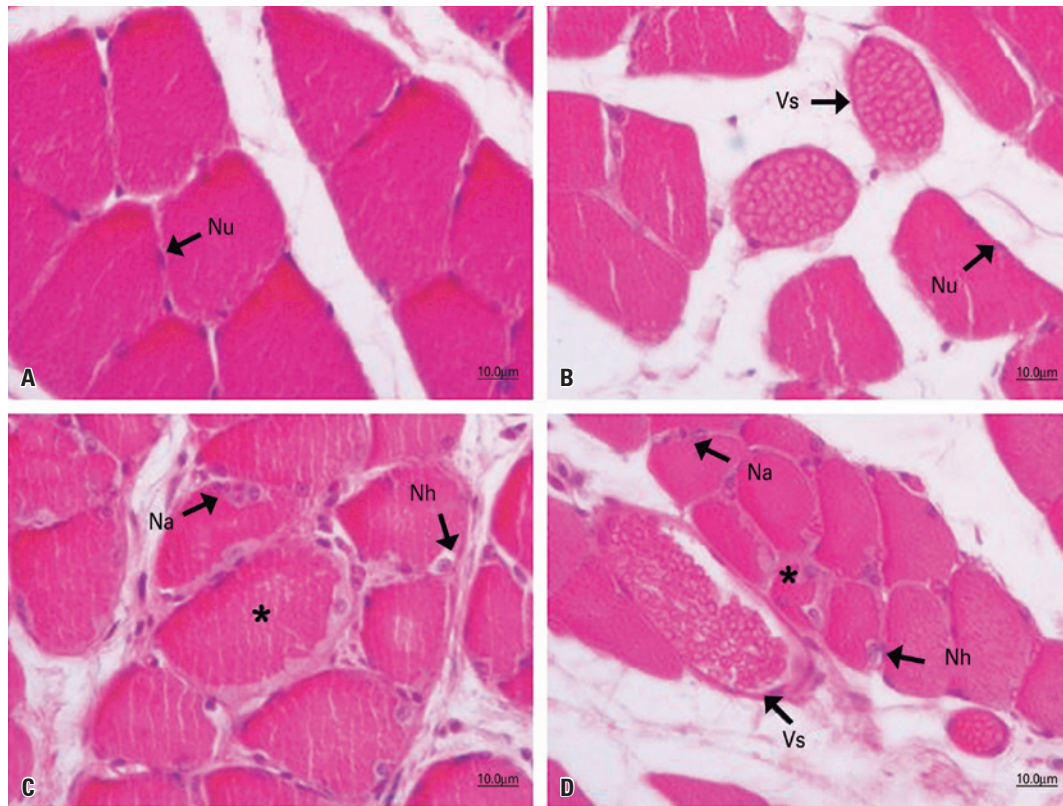


Figura 2. Fotomicrografias do músculo sóleo de ratos Wistar, corte transversal, coloração em hematoxilina e eosina. Grupo Controle (A), Grupo Vanilina (B), Grupo Lesão (C) e Grupo Lesão + Vanilina (D). Em A, organização fascicular com fibras poligonais e núcleos (Nu) periféricos. Em B, organização tecidual semelhante ao Grupo Controle, com vasos sanguíneos dilatados (Vs). Em C, fibras musculares com mudança de coloração (*), núcleos hipertróficos (Nh) e aglomerados (Na) na periferia da fibra. Em D, fibra polimórfica em regeneração (*), núcleos hipertróficos (Nh) e aglomerados (Na) na periferia da fibra, e vasos sanguíneos dilatados (Vs)

Nos animais submetidos à compressão nervosa e tratados com vanilina (GLV), foram verificadas diferenças na resposta dos dois músculos estudados. No tibial anterior, as fibras musculares apresentavam-se com características morfológicas mais acentuadas de lesão quando comparadas ao GL, com aumento do número das células satélites, núcleos centrais e diminuição no tamanho das fibras, bem como maior desorganização e degeneração fascicular. Nestes animais, foram observadas fibras musculares lesionadas, algumas em degeneração e outras já em regeneração, associadas ao grande número de capilares sanguíneos, podendo denotar

neovascularização (Figura 1D). Para o músculo sóleo, foram verificadas as mesmas características do GL e, além destas, extenso aumento na vascularização, com vasos sanguíneos túrgidos e dilatados (Figura 2D).

A compressão nervosa reduziu a área de secção transversa da fibra dos dois músculos estudados. Para o tibial anterior, houve diminuição na área em GL e em GLV em relação ao GC ($p < 0,01$) e ao GV ($p < 0,001$). Para o sóleo, a área de secção transversa da fibra foi menor no GL e no GLV em relação ao GC ($p < 0,05$; $p < 0,01$) e ao GV ($p < 0,05$; $p < 0,01$), sendo que o tratamento com vanilina não afetou este parâmetro (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros morfométricos dos músculos tibial anterior e sóleo

Parâmetros	Músculos	Grupos			
		GC	GV	GL	GLV
Área de secção transversa (μm^2)	Tibial anterior	2042,2 \pm 438,6	2232,3 \pm 452,4	1430,8 \pm 286,7*†	1310,7 \pm 208,6*†
	Sóleo	2550,4 \pm 793,8	2584,4 \pm 188,3	1789,2 \pm 311,9*†	1524,7 \pm 307,8*†
Menor diâmetro (μm)	Tibial anterior	41,2 \pm 4,95	41,4 \pm 4,12	33,8 \pm 2,67*†	33,1 \pm 2,28*†
	Sóleo	44,3 \pm 8,40	44,1 \pm 2,89	39,4 \pm 3,50	34,6 \pm 4,25*†
Tecido conjuntivo (%)	Tibial anterior	2,8 \pm 0,25	3,0 \pm 0,82	3,4 \pm 0,53	5,2 \pm 1,67*††
	Sóleo	7,9 \pm 0,70	6,6 \pm 2,03	6,8 \pm 2,09	7,0 \pm 1,36

Análise de Variância unidirecional com pós-teste de Tukey. * diferente de GC; † diferente de GV; †† diferente de GL.

GC: Grupo Controle; GV: Grupo Vanilina; GL: Grupo Lesão; GLV: Grupo Lesão + Vanilina.

Quanto ao menor diâmetro da fibra muscular, a lesão nervosa também causou diminuição no parâmetro analisado para o músculo tibial anterior, com diferenças no GL e no GLV em comparação com o GC ($p < 0,01$; $p < 0,001$) e o GV ($p < 0,01$; $p < 0,001$). No músculo sóleo, houve redução no diâmetro da fibra dos animais do GLV em relação aos GC ($p < 0,01$) e GV ($p < 0,01$).

No músculo tibial anterior, houve aumento na quantidade de tecido conjuntivo intramuscular dos animais do GLV em relação aos demais grupos ($p < 0,001$). No músculo sóleo, não houve diferença significativa na quantidade de tecido conjuntivo entre os grupos.

DISCUSSÃO

O modelo de compressão do nervo isquiático realizado no presente estudo pode ser descrito como uma lesão do tipo axonotmese,^(11,12) que leva à interrupção da comunicação neuromuscular. Foram verificadas alterações morfométricas nos músculos tibial anterior e sóleo dos animais do GL, com redução da área de secção transversa e menor diâmetro da fibra muscular. Esse conjunto de características é comum em lesões nervosas e pode estar acompanhado de incapacidades funcionais.⁽¹³⁻¹⁵⁾

As alterações morfológicas observadas nos animais do GL confirmam que a lesão nervosa causou a interrupção da comunicação neuromuscular. Fibras musculares com contornos irregulares e núcleos centralizados também foram evidenciadas por Polônio et al.,⁽¹⁶⁾ no músculo tibial anterior de ratos submetidos à secção completa do nervo isquiático, e caracterizam um conjunto de alterações bioquímicas e mecânicas nas fibras, que podem culminar em graus variados de perda funcional.

A administração oral de vanilina nos animais do GV não alterou os parâmetros morfométricos e morfológicos das fibras dos músculos estudados, embora tenha havido aumento na vascularização do sóleo, evidenciado pela maior quantidade de vasos sanguíneos, frequentemente dilatados. Neste sentido, o presente estudo se contrapõe aos resultados de alguns autores, que apontam o potencial antiangiogênico da vanilina,⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ mas está de acordo ao proposto por Raffai et al.,⁽²⁰⁾ que verificam que a vanilina promove relaxamento arterial por meio da inibição dos canais de Ca^{2+} , impedindo o influxo de Ca^{2+} na célula, ou seja, apresentando propriedade vasodilatadora.

Além do potencial antiangiogênico e vasodilatador, outras propriedades já foram descritas para a vanilina, como antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa, bem como antitumoral.^(18,19,21) Sua biocompatibilidade

associada ao perfil anti-inflamatório poderia tornar a vanilina um composto promissor e, no presente estudo, foram verificadas respostas distintas nos músculos tibial anterior e sóleo diante da ingestão oral de vanilina nos animais submetidos à lesão prévia do nervo isquiático.

Três semanas após a lesão nervosa, as fibras musculares ainda estão envolvidas no processo de regeneração,⁽²²⁾ etapa na qual mediadores inflamatórios estão presentes no tecido. No músculo tibial anterior, o tratamento com vanilina causou a intensificação da resposta inflamatória, visto que houve piora da morfologia tecidual em relação aos animais do GL. Já para o sóleo, pode-se inferir que, apesar da maior quantidade de vasos sanguíneos, a vanilina não exerceu efeito positivo ou negativo sobre a morfologia das fibras, que se assemelhavam às do GL.

Na fase inicial da lesão muscular, os neutrófilos invadem rapidamente o local da lesão e promovem o início do reparo pela entrega de citocinas, que atraem e ativam células inflamatórias adicionais.^(22,23) Segundo Tidball,⁽²⁴⁾ os neutrófilos podem eventualmente exacerbar injúrias prévias devido a liberação ou geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem levar à perda da integridade celular e até necrose da fibra.⁽²⁵⁾ Em condições normais, as EROs são eliminadas por sistemas antioxidantes presentes nos músculos. Segundo Muller et al.,⁽²⁶⁾ músculos compostos por maior quantidade de fibras do tipo II, como o tibial anterior, são mais suscetíveis a danos oxidativos do que fibras do tipo I, de contração lenta, como o sóleo. Neste sentido, a vasodilatação e a aparente neovascularização causadas pelo tratamento com vanilina pode ter causado maior liberação de mediadores inflamatórios, como os neutrófilos, que causaram estresse oxidativo no músculo tibial anterior, exacerbando o processo lesivo.

Ainda, segundo Csete et al.,⁽²⁷⁾ o comportamento das células satélites pode ser modificado pela concentração de oxigênio no tecido, por processos mediados pela geração de EROs.⁽²⁸⁾ Recentemente, em um estudo *in vitro*, pesquisadores demonstraram que a proliferação e a diferenciação dos mioblastos é negativamente influenciada pelo aumento na concentração de oxigênio.⁽²⁹⁾ Assim, o aumento do fluxo sanguíneo gerado pela vanilina causou elevação na concentração tecidual de oxigênio, o que pode ter dificultado o processo normal de regeneração muscular via ativação das células satélites, de modo que o músculo tibial anterior ainda apresentasse grande quantidade de fibras em processo degenerativo.

Verificou-se, no presente estudo, que o tratamento com vanilina promove seus efeitos por meio da alteração no fluxo sanguíneo tecidual, marcadamente pela

vasodilatação intramuscular. Como limitação, acreditamos que metodologias específicas para a avaliação vascular sejam importantes para elucidar definitivamente os efeitos da vanilina, assim como o estudo em diferentes grupos musculares, de modo a esclarecer se sua ação é, de fato, relacionada ao tipo de fibra que compõe a maior proporção do músculo. Cabe ressaltar que são escassas, na literatura, os efeitos da vanilina *in vivo*, e que mais estudos são necessários previamente à indicação da substância para tratamento.

CONCLUSÃO

A compressão do nervo isquiático é responsável por causar alterações morfológicas nos músculos tibial anterior e sóleo. O tratamento com vanilina apresentou característica pró-inflamatória no tibial anterior, o que não aconteceu no músculo sóleo, respostas estas relacionadas provavelmente ao aumento no fluxo sanguíneo tecidual e na capacidade de cada músculo em responder a esta alteração.

REFERÊNCIAS

- Eser F, Aktekin LA, Bodur H, Atan C. Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. *Neurol India*. 2009;57(4):434-7.
- Sebben AD, Cocolichio F, Schmitt AP, Curra MD, Silva PV, Tres GL, et al. [Effect of neurotrophic factors on peripheral nerve repair]. *Scientia Medica*. 2011;21(2):81-9. Portuguese.
- Possamai F, Pacheco DR, Santos TS, André ES. [Morphological and functional repercussion on peripheral nerve regeneration after exercises]. *Fisioter Mov*. 2012;25(3):617-27. Portuguese.
- Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. *Eletroterapia clínica*. 3a ed. São Paulo: Manole; 2003.
- Adami N, Biral D, Caccavale S, Rossini K. Histology of the long term denervated rat muscle. *Basic Appl Myol*. 2006;16(3-4):113-4.
- Lewis DM, al-Amood WS, Schmalbruch H. Effects of long-term phasic electrical stimulation on denervated soleus muscle: guinea-pig contrasted with rat. *J Muscle Res Cell Motil*. 1997;18(5):573-86.
- Helpenstein Junior M, Goldenfum MA, Siena C. Lombalgia ocupacional. *Rev Ass Med Bras*. 2010;56(5):583-9. Review.
- Silva JC, Saraiva SR, Oliveira Júnior RG, Almeida JR. Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products: a review. *Rev Bras Farm*. 2013;94(1):18-23. Review.
- Beaudry F, Ross A, Lema PP, Vachon P. Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytother Res*. 2010;24(4):525-30.
- Srikanth D, Menezes VH, Saliyan N, Up R, Shiv PG, Acharya SD, et al. Evaluation of anti-inflammatory property of vanillin in carrageenan induced paw edema model in rats. *Int J Bioassays*. 2013;2(1):269-71.
- Possamai F, Siepko CM, André ES. [Investigation of therapeutic exercise effects on peripheral nerve regeneration]. *Acta Fisiatr*. 2010;17(4):142-7. Portuguese.
- van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, Helden PJ, Gispen WH. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil*. 1997;78(1):70-7. Review.
- Fernandes KC, Polacow ML, Guirro RR, Campos GE, Somazz MC, Pinto VF, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter*. 2005;9(2):235-41.
- Caierão QM, Betini J, Teodori RM, Minamoto VB. [The effect of time interval between electrical stimulation on the denervated rat muscle]. *Rev Bras Fisioter*. 2008;12(2):143-8. Portuguese.
- Silva-Couto MA, Gigo-Benato D, Tim CR, Parizotto NA, Salvini TF, Russo TL. Effects of low-level laser therapy after nerve reconstruction in rat denervated soleus muscle adaptation. *Rev Bras Fisioter*. 2012;16(4):320-7.
- Polônio JT, Mazzer N, Barbieri CH, Matiolo-Sverzut AC. [Structure and function of denervated tibialis anteriores are maintained by electrical stimulation in rats]. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(2):85-9.
- Fukuoka K, Sawabe A, Sugimoto T, Koga M, Okuda H, Kitayama T, et al. Inhibitory actions of several natural products on proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by Hsp60 from *Chlamydia pneumoniae* J138. *J Agric Food Chem*. 2004;52(20):6326-9.
- Lirdprapamongkol K, Kramb JP, Suthiphongchai T, Surarit R, Srisomsap C, Dannhardt G, et al. Vanillin suppresses metastatic potential of human cancer cells through PI3K inhibition and decreases angiogenesis in vivo. *J Agric Food Chem*. 2009;57(8):3055-63.
- Jung HJ, Song YS, Kim K, Lim CJ, Park EH. Assessment of the anti-angiogenic, anti-inflammatory and antinociceptive properties of ethyl vanillin. *Arch Pharm Res*. 2010;33(2):309-16.
- Raffai G, Khang G, Vanhoutte PM. Vanillin and vanillin analogs relax porcine coronary and basilar arteries by inhibiting L-type Ca²⁺ channels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;352(1):14-22.
- Lee D, Bae S, Hong D, Lim H, Yoon JH, Hwang O, et al. H2O2-responsive molecularly engineered polymer nanoparticles as ischemia/reperfusion-targeted nanotherapeutic agents. *Sci Rep*. 2013;3:2233.
- Armstrong RB, Warren GL, Warren JA. Mechanisms of exercise-induced muscle fiber injury. *Sports Med*. 1991;12(3):184-207. Review.
- Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2):R345-53. Review.
- Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(7):1022-32. Review.
- Sjödín B, Hellsten Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med*. 1990;10(4):236-54. Review.
- Muller FL, Song W, Liu Y, Chaudhuri A, Piek-Dahl S, Strong R et al. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(11):1993-2004.
- Csete M, Walikonis J, Slawny N, Wei Y, Korsnes S, Doyle JC, et al. Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture. *J Cell Physiol*. 2001;189(2):189-96.
- Hansen JM, Klass M, Harris C, Csete M. A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis-implications for regeneration in aged muscle. *Cell Biol Int*. 2007;31(6):546-53.
- McCormick R, Pearson T, Vasilaki A. Manipulation of environmental oxygen modifies reactive oxygen and nitrogen species generation during myogenesis. *Redox Biol*. 2016;8:243-51.