

Patologia muscolare nella paraplegia da lesione del motoneurone spinale e recupero funzionale con stimolazione elettrica domiciliare

Ugo Carraro (1), Helmut Kern (2)

(1) Laboratory of Translational Myology, Interdepartmental Research Center of Myology, University of Padova, Italy; (2) Ludwig Boltzmann Institute of Electrical Stimulation and Physical Rehabilitation, Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Wilhelminenspital Wien, Austria.

Abstract

Muscle pathology in lower motor neuron paraplegia and h-b FES

After complete Spinal Cord Injury (SCI), causing complete disconnection between the muscle fibers and the nervous system, the denervated muscles become unexcitable with commercial electrical stimulators within several months and undergo severe atrophy and disorganization of contractile apparatus after 1-3 years. Years after the injury the surviving and regenerated myofibers are substituted with adipocytes and collagen. To counteract the progressive changes transforming muscle into an unexcitable tissue, we developed a novel therapy concept for paraplegic patients with complete lower motor neuron (LMN) denervation of the lower extremities. The new stimulators for home-based functional electrical stimulation (h-b FES) have been designed to reverse longstanding and severe atrophy of LMN denervated muscles by delivering high-intensity (up to 2,4 J) and long-duration impulses (up to 150 ms) able to elicit contractions of denervated skeletal muscle fibers in absence of nerve. Concurrent to the development of the stimulation equipment, specific clinical assessments and training strategies were developed at the Wilhelminenspital Wien, Austria. Main results of our clinical study on 20 patients, which completed a 2 years h-b FES program are: 1. significant +33% increase of muscle size and +75% of the mean diameter of muscle fibers, with striking improvements of the ultra-structural organization of contractile material; 2. recovery of the tetanic contractility with significant increase in muscle force output during electrical stimulation; 3. five subjects performed FES-assisted stand-up and stepping-in-place exercises; 4. data from ultrastructural analyses indicating that the shorter the time span between SCI and the beginning of h-b FES, the larger were the number and the size of recovered fibers. The study demonstrates that h-b FES of permanent LMN denervated muscle is an effective home therapy that results in rescue of muscle mass, function and perfusion. Additional important benefits for the patients are the improved cosmetic appearance of lower extremities and the enhanced cushioning effect for seating.

Key Words: skeletal muscle, morphometry, paraplegia, lower motor neuron, FES recovery

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 20 (1): 25-32, 2010.

Riassunto

Dopo lesioni spinali o periferiche che causino la completa disconnessione tra sistema nervoso e muscolare, le fibre muscolari denervate diventano ineccitabili utilizzando stimolatori elettrici commerciali, a causa della disorganizzazione dell'apparato contrattile entro alcuni mesi e di una atrofia severa dopo 2-3 anni. Solo dopo molti più anni di denervazione permanente le fibre muscolari originarie e quelle rigenerate sono completamente sostituite da adipociti e fibre collagene. Per questi

pazienti sono stati costruiti nuovi stimolatori per la stimolazione elettrica funzionale domiciliare (h-b FES) che scaricano impulsi elettrici di alta intensità (fino a 2,4 J) e lunga durata (fino a 150 ms) capaci di indurre mediante larghi elettrodi cutanei la contrazione delle fibre muscolari denervate. Contemporaneamente il Wilhelminenspital di Vienna in Austria ha sviluppato un protocollo di valutazione clinico-funzionale per l'ottimizzazione del programma riabilitativo progressivo. I risultati di 20 pazienti, che hanno completato lo studio di 2 anni di h-b FES, sono: 1.

Muscle pathology in LMN denervation and h-b FES

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 20 (1&2): 25-32, 2010

aumento del +33% della massa muscolare e del +75% del diametro delle fibre muscolari con miglioramento significativo dell'organizzazione ultrastrutturale del materiale contrattile; 2. recupero della contrattilità tetanica con significativo aumento della forza muscolare indotta dalla stimolazione elettrica; 3. cinque persone hanno acquisito la capacità di alzarsi in piedi e di eseguire esercizi di passo simulato utilizzando barre parallele; 4. i dati della microscopia ottica ed elettronica confermano che prima si inizia la h-b FES più grandi e più numerose sono le fibre muscolari dei muscoli elettrostimolati. Questo studio dimostra che la h-b FES dei muscoli permanentemente denervati è un'efficace terapia domiciliare che fa recuperare massa, funzione e perfusione tissutale. Ulteriori importanti benefici per i pazienti sono il miglioramento dell'estetica e dell'effetto cuscino di glutei e muscoli delle cosce.

Numerose cause genetiche ed acquisite determinano gravi deficit motori, a loro volta responsabili di lunghi periodi di pessima qualità di vita ed infine della conclusione drammatica della storia dei soggetti affetti. Pediatri e neurologi dibattono l'etiologia e la patogenesi di patologie ereditarie come la sclerosi laterale amiotrofica, ed hanno molte speranze ma poche certezze terapeutiche. Nonostante l'enorme massa di conoscenze nelle patologie motorie post-traumatiche, medici dello sport, ortopedici, chirurghi plastici, fisioterapisti si scontrano con difficoltà insormontabili in una percentuale ancora troppo elevata di casi [11,15,20,38].

Nonostante lo sviluppo tumultuoso negli ultimi decenni delle tecniche diagnostiche e degli approcci microchirurgici, un salto qualitativo nel trattamento delle patologie muscolari neurogene potrà essere atteso solo dall'applicazione in ambito clinico di risultati né programmabili né prevedibili della ricerca miologica fondamentale. E' anche vero però che serie di osservazioni cliniche aprono prospettive inattese di ricerca fondamentale. Un esempio di risultati della ricerca clinica [1,3-10,18,19,29-31,34] che hanno arricchito le conoscenze di base della miologia viene dalla validazione di strategie riabilitative del muscolo scheletrico permanentemente denervato.

Negli ultimi anni abbiamo, infatti, accumulato risultati interessanti (e da noi del tutto inattesi) sul decorso dell'atrofia da denervazione del muscolo scheletrico umano a seguito di lesioni irreversibili del motoneurone spinale. Chiameremo questa condizione denervazione flaccida per il ruolo patogenetico dell'assenza di ripetuti eventi di tensione cellulare nella progressione da semplice atrofia a degenerazione del tessuto muscolare denervato permanentemente per lesioni dei motoneuroni spinali (in inglese: lower motor neuron, LMN).

Ricordiamo che nel caso di lesioni del primo motoneurone, sia a livello corticale, che in lesioni spinali, l'atrofia da disuso conseguente non supera mai la perdita di massa muscolare superiore al 50-70%, forse in relazione al mantenimento dell'arco riflesso, che induce contrazioni talora eccessive (tipiche della paraplegia spastica), ma in ogni caso in presenza di carichi muscolari limitati o assenti. I profili delle miofibre, che nel tessuto normale sono separate da quantità virtuali di connettivo lasso, sono rotondeggianti e ben connesse, sia nel medio sia nel lungo termine, nei muscoli di soggetti affetti da paraplegia spastica mostrano invece profili delle miofibre ben separati dall'interstizio (edema/modesta fibrosi). Le miofibre hanno diametri molto più variabili presentando sia miofibre rigonfie che rare miofibre di piccolo o piccolissimo diametro. Coerentemente, sia a medio sia a lungo termine aumenta nello stesso grado il connettivo lasso, mentre molto rari restano gli adipociti e la fibrosi. Non ci sono differenze significative cioè per quanto riguarda l'aumento dell'endomisio tra muscoli paralizzati da 3-5 o 15-20 anni ($p = 0.31$), che sono invece ambedue molto significativamente diversi dalla serie dei muscoli umani normali ($p < 0.001$) [22].

Nelle denervazioni periferiche per lesioni dei nervi motori o nella paraplegia flaccida dovuta a lesioni traumatiche od ischemiche del soma del motoneurone spinale, l'atrofia progredisce fino ad una completa degenerazione del tessuto muscolare scheletrico, che viene sostituito da tessuto adiposo ed infine dalla fibrosi tissutale. In Figura 1 si può apprezzare l'entità dei cambiamenti osservati nei prelievi biopsici eseguiti prima del FES training nei soggetti arruolati in uno studio prospettico longitudinale, il Progetto Europeo RISE (Alzati!). Sorprendentemente i muscoli ad un anno circa dalla lesione spinale presentano muscoli ancora ben conservati, seppure notevolmente atrofici (B). E' solo dal terzo anno che prevalgono gli aspetti francamente distrofici con sostituzione adiposa e fibrosa della popolazione di miofibre denervate (C). L'analisi istologica non è però completamente rappresentativa del decorso post-lesionale, perché tra quello che appare, a un'osservazione affrettata tessuto connettivo lasso sono invece presenti numerosissime miofibre muscolari "severamente" atrofiche. Esse hanno cioè perso completamente il materiale contrattile e presentano una del tutto peculiare distribuzione a gruppi dei nuclei, separati da tratti di miofibre in cui nuclei e proteine contrattili sarcomeriche sono assenti. Le miofibre denervate sopravvivono molto più a lungo di quanto generalmente accettato e descritto in letteratura, non solo nei muscoli sperimentali dei roditori [1], ma anche dei pazienti con lesioni massive croniche del secondo motoneurone [23].

Muscle pathology in LMN denervation and h-b FES

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 20 (1&2): 25-32, 2010

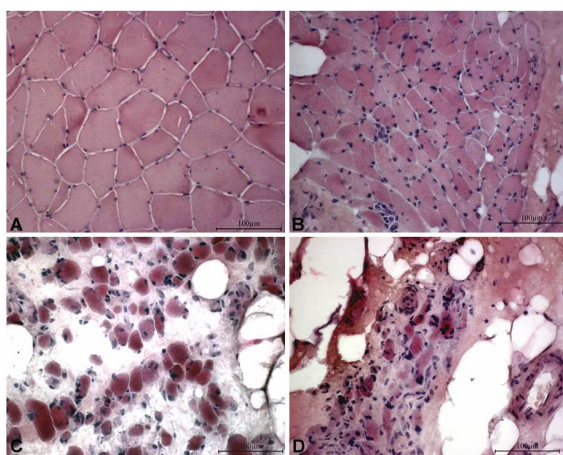


Fig. 1 A, muscolo vasto laterale umano normale. B-D, prelievi biotipici eseguiti prima di h-b FES training nei soggetti arruolati nel Trial Europeo RISE (Alzati!), B, 0,9 anni di denervazione; C, 3,3 anni di denervazione; D, 8,7 anni di denervazione. Ad un anno circa dalla lesione spinale le fibre muscolari sono ancora ben conservate, seppure notevolmente atrofiche (B). E' solo dal terzo anno che prevalgono gli aspetti francamente distrofici con sostituzione adiposa e fibrosa (C), molto accentuata dopo circa 10 anni di denervazione flaccida (D).

Queste ipotesi patogenetiche sono molte rinforzate dai risultati di recupero trofico e in parte funzionale (la recuperata abilità di sostenere contrazioni tetaniche sotto carico) mediante una strategia riabilitativa di stimolazione elettrica funzionale della muscolatura flaccida (che deve naturalmente essere continuata per tutta la vita del soggetto, perché deve supplire all'assenza degli eventi contrattili dovuti all'innervazione o alla sperata reinervazione). Sebbene restino alcune questioni aperte, i risultati del Progetto Europeo RISE (ALZATI!) dimostrando che la degenerazione muscolare secondaria a lesioni permanenti del motoneurone spinale è prevenibile e almeno in parte reversibile, incoraggiano a riprendere in considerazione strategie di stimolazione elettrica a lungo termine della muscolatura scheletrica anche nei casi di atrofie muscolari secondarie a lesioni del primo motoneurone o nei più complessi casi di trasferimenti di lembi muscolari liberi (e cioè denervati) resi possibili dalla microchirurgia ricostruttiva vasale.

La serie numerosa e ben distribuita nel tempo di biopsie di muscoli cronicamente "flaccidi" del Trial EU RISE ci ha anche permesso di costatare, con nostra sorpresa, la "resistenza al disuso da denervazione periferica" del tessuto muscolare scheletrico umano, almeno in confronto alla cinetica di atrofia/degenerazione dei muscoli degli arti nel ratto [1-10,29,31,32,36]. Il processo che nel ratto evolve in mesi, fino all'apparente scomparsa di tutte le miofibre,

impiega nell'uomo due-tre anni (Figura 2). Risultati concordanti sono stati accumulati da uno studio prospettico di biopsie muscolari da lembi liberi [35].

Sebbene le miofibre umane perdano in pochi mesi la capacità di contrarsi per stimolazione diretta con gli elettrostimolatori di normale uso clinico a causa della disorganizzazione dei tubuli T (che normalmente trasmettono il segnale per il rilascio del calcio all'interno della miofibrilla) e dei sarcomeri [19,21,36], esse mantengono per tempi inaspettatamente lunghi la capacità di controllare il potenziale di membrana a riposo e di condurre potenziali d'azione [36].

L'apparato di accoppiamento eccitazione-contrazione ha un ruolo nella progressione dall'atrofia alla distrofia del muscolo scheletrico umano denervato per lesioni spinali o periferiche del secondo motoneurone. Già nella fase di atrofia semplice si attua la dissociazione tra sarcolemma (tubuli T) e reticolo sarcoplasmatico. In tal modo anche gli eventuali eventi di fibrillazione, che caratterizzano le fasi acute della denervazione motoria, cessano di produrre effetti meccanici e metabolici importanti per il blocco del rilascio di ioni calcio dalle triadi.

La stimolazione elettrica domiciliare iniziata entro i primi anni dalla lesione ai motoneuroni spinali attivando nelle fibre muscolari i cicli di rilasciamento e recupero intra luminale degli ioni calcio, modifica l'espressione genica bloccando la degradazione proteica e attivando la sintesi delle proteine contrattili e di quelle del sistema di accoppiamento eccitazione-contrazione [36].

Solo molti mesi (nel ratto) o anni (nell'uomo) di denervazione periferica producono nelle miofibre l'incapacità di rispondere anche ad elevatissime correnti elettriche. La parziale sostituzione del volume muscolare perso con tessuto adiposo e fibroso è un processo relativamente precoce, la progressiva scomparsa delle miofibre (forse per veri processi terminali di apoptosi) è un evento che compare nel ratto dopo più di un anno di denervazione (un terzo dell'aspettativa di vita dei ratti di laboratorio) e deducibile nel caso di biopsie umane prelevate dopo decenni di denervazione, come è descritto nelle sequele tardive della poliomielite.

Le caratteristiche morfologiche del tessuto muscolare cronicamente denervato nei roditori suggeriscono che nelle fasi di comparsa di eventi di apoptosi/necrosi delle miofibre questi eventi lesivi vengano seguiti (almeno per una minoranza di casi) da cicli ripetuti di rigenerazione muscolare [10,29,32]. Anche le biopsie che abbiamo studiato nell'ambito del progetto RISE presentano tra la maggioranza delle miofibre con caratteristiche tipiche della denervazione (piccole miofibre angolate o appiattite), poche piccole fibre rotonde che sono positive con un anticorpo monoclonale contro la miosina embrionale (Figura 3).

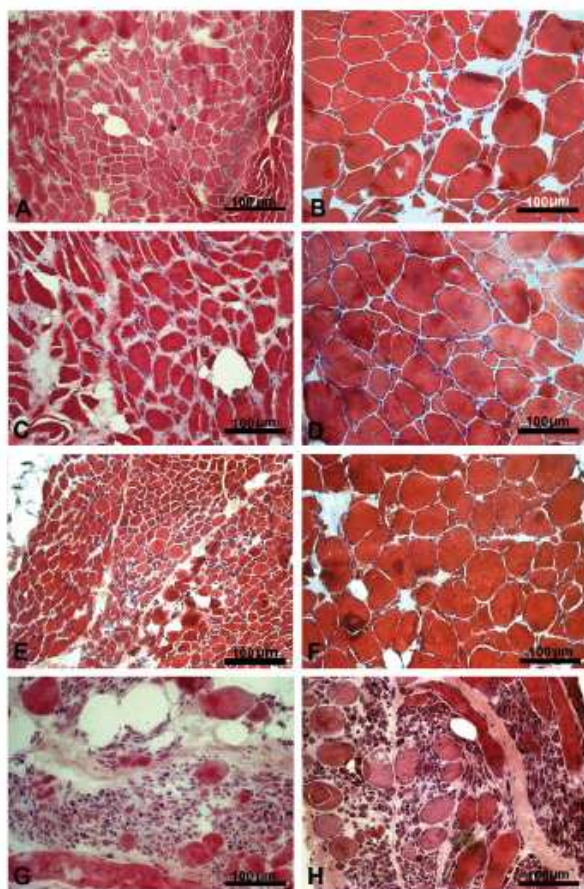


Fig. 2 Due anni di h-b FES recupera dall'atrofia i muscoli umani denervati da lesione del motoneurone spinale. Un anno (A) e tre anni (B) di denervazione prima e dopo h-b FES; due anni (C) e quattro anni (D) di denervazione prima e dopo h-b FES; tre anni (E) e cinque anni (F) di denervazione prima e dopo h-b FES; otto anni (G) e dieci anni (H) di denervazione prima e dopo h-b FES.

Poiché l'espressione dei geni embrionali dura nella miogenesi rigenerativa pochi giorni, anche nel caso di muscoli denervati alla nascita o nella maturità [1,9,10,17,32,34,35], possiamo concludere che abbiamo prove dirette di eventi rigenerativi in tutte le biopsie muscolari raccolte da soggetti tra 1- e 37-anni dalla lesione spinale irreversibile [9]. Anche nelle biopsie dei soggetti trattati da 2- a 10-anni con stimolazione elettrica funzionale (FES) gli eventi rigenerativi sono presenti, ma in percentuale significativamente inferiore rispetto ai muscoli cronicamente denervati per lesione permanente del motoneurone spinale [9,19]. Queste osservazioni sono ulteriori solide prove dell'efficacia della strategia riabilitativa mediante FES domiciliare messa a punto a Vienna. Nel loro complesso il data base delle analisi

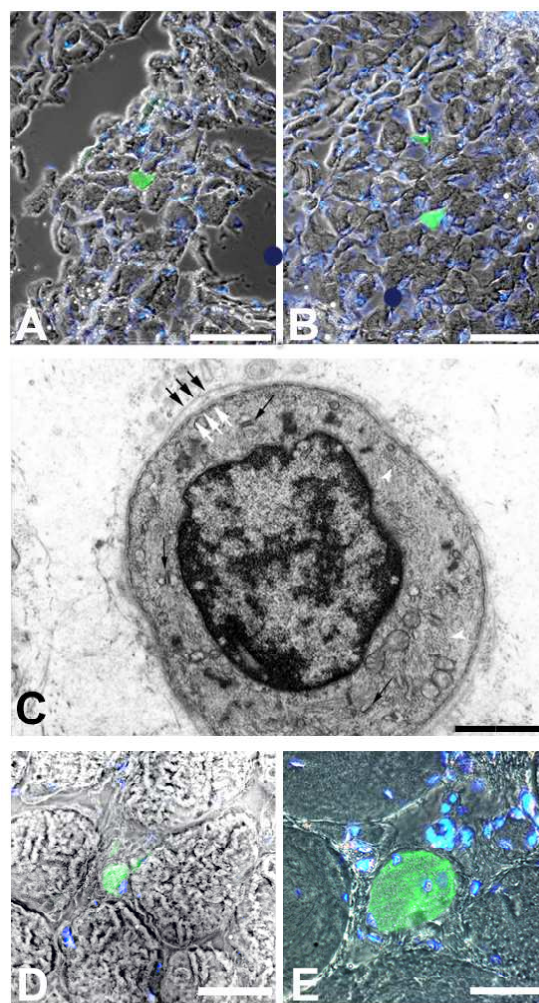


Fig. 3 Eventi rigenerativi nel muscolo denervato con e senza FES: immuno-istochimica e microscopia elettronica. A) 9-mesi di denervazione e B) 6-anni di denervazione. Le miofibre rigenerate precoci si colorano in verde con l'anticorpo anti-MHCemb. Calibro: 100 µm. C) Microscopia Elettronica di miotubi rigeneranti nel muscolo denervato da lungo tempo: due strati di lamina basale (le punte di freccia nere e bianche puntano sullo strato vecchio e su quello nuovo della membrana basale) Calibro: 1.0 µm. D) 7-anni di denervazione seguiti da 4-anni di FES Training e E) 5-anni di denervazione seguiti da 2-anni di FES Training. Le miofibre rigenerate sono colorate in verde dall'anticorpo anti-MHCemb. Si noti il maggior calibro delle miofibre dopo FES Training.

biottiche che abbiamo accumulato su soggetti spastici, flaccidi e flaccidi trattati dimostrano che il protocollo di stimolazione elettrica è sicuro (*primum non nocere*):

Muscle pathology in LMN denervation and h-b FES

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 20 (1&2): 25-32, 2010

come minimo non induce più eventi di danno e rigenerazione muscolare della denervazione *per se* [9]. La morfometria delle miofibre conferma che il FES training è anche efficace, almeno come fattore eutrofizzante (Figura 2) [18,28,31,34].

Tutte queste osservazioni sulla capacità inattesa delle miofibre muscolari scheletriche di sopravvivere a lungo all'assenza di eventi contrattili (denervazione flaccida con degenerazione muscolare accompagnata da eventi di miogenesi rigenerativa) aprono nuove prospettive sull'uso (prossimo, futuro o futuribile) nella ricostruzione di muscoli avulsi o chirurgicamente trasposti [35] o di tessuto muscolare ectopico (ad esempio, per migliorare i processi di guarigione nell'infarto miocardico) [11]. Certamente esse avranno presto un ruolo nella prevenzione/cura delle complicanze tardive (ulcere da decubito non altrimenti risolvibili) in soggetti allettati per patologie cardiocircolatorie, metaboliche (diabete) e/o neurodegenerative centrali od immobilizzati per lesioni spinali (genetiche o post-traumatiche) o dei nervi periferici, in particolare nei paraplegici flaccidi. Le prospettive sono anche più incoraggianti per la più ampia popolazione di soggetti con deficit di mobilità per lesione dei motoneuroni corticali o delle vie piramidali [15,26]. In tutti questi casi stanno sollevando grandi aspettative: 1. strategie di "allenamento" (in realtà di recupero dalle conseguenze di gravi e meno gravi conseguenze del disuso muscolare), che abbiano le loro basi razionali nelle conoscenze delle risposte dei canali sarcolemmi meccanici-attivati, che sembrano svolgere un ruolo regolativo fondamentale del trofismo "basale" delle miofibre muscolari, in particolare in miofibre che hanno perso la capacità di produrre e sostenere contrazioni tetaniche. 2. La ricerca, la validazione e lo sviluppo di nuovi approcci di stimolazione elettrica intra-muscolare (diretta od indiretta, vale a dire tramite le terminazioni nervose para- od intra-muscolari), che possano realizzare selettive o sequenziali stimolazioni coordinate di più gruppi di fibre e/o muscoli. Naturalmente una tale strategia richiede la collaborazione di Miologi, Matematici, Fisici e Bioingegneri. Il gruppo di Vienna include fortunatamente oltre all'inventore della strategia riabilitativa per il muscolo denervato, un gruppo multidisciplinare di esperti in queste discipline, che collaborano con i colleghi italiani e di altre università europee.

La sopravvivenza a lungo termine (anni) delle miofibre denervate apre nuovi scenari anche di ricerca muscolare fondamentale (quali meccanismi genetici od epigenetici regolano il mantenimento di miofibre vitali, anche se completamente prive di materiale contrattile, ma capaci di produrre e trasmettere il potenziale d'azione?) e di prospettive cliniche (quale è il ruolo dello stiramento passivo in questa regolazione e quali

le possibilità di modularne con farmaci la risposta nelle miofibre a fini riabilitativi trofico/funzionali?).

Le nostre pionieristiche osservazioni sulla peculiare resistenza alla denervazione dell'emidiaframma di ratto cronicamente denervato, correlabile con la permanente ritmica tensione imposta dall'emidiaframma innervato controlaterale (che naturalmente va incontro ad ipertrofia vicariante), indicano che questo modello sperimentale potrebbe offrire facile materiale di studio (l'emidiaframma è la preparazione neuromuscolare per eccellenza della farmacologia della contrazione neuromuscolare) per comprendere e valorizzare i meccanismi molecolari sottesi ai movimenti attivi e passivi delle fibre muscolari scheletriche e pesare il ruolo dei fattori genetici e di quelli epigenetici nella regolazione del trofismo tessutale.

Altre domande fondamentali aspettano risposte dai ricercatori di base: Perché ci sono così importanti differenze nella suscettibilità all'atrofia post-denervazione tra specie diverse? Siamo di fronte a meccanismi regolativi legati alla longevità, alla massa delle miofibre o ad altre caratteristiche metabolico-ormonali delle diverse specie?

L'ipotesi che favoriamo, e vorremmo testare in studi di miologia comparata, è che la sopravvivenza delle miofibre alla denervazione periferica sia una caratteristica pre-programmata (genetica) correlata alla "lunghezza" degli arti: le miofibre sarebbero "capaci di attendere" tutto il tempo che è necessario perché una lesione all'anca del nervo sciatico possa guarire per rigenerazione degli assoni e reinnervazione dei muscoli dell'arto inferiore (zampa o piede). E' un'ipotesi semplificatrice, ma che ha una qualche ragione finalistica, un valore selettivo, per le specie che contano sulla mobilità fin dalla più giovane età per procacciarsi il cibo e/o per sfuggire ai pericoli. Un'altra ipotesi correla la longevità delle miofibre denervate al loro diametro medio, con l'idea che vi sia una "riserva di trofismo" nella massa delle miofibre. In ogni caso è sorprendente che ad una domanda tanto semplice (quanto sopravvive una miofibra muscolare umana denervata o rigenerata in permanente assenza di nervo, un caso sperimentalmente più interessante) non si trovi risposta nella letteratura dedicata alle problematiche della denervazione-reinnervazione muscolare. Più correttamente, non abbiamo trovato tale risposta con una ricerca bibliografica, crediamo accurata, in PUBMED.

Tante domande stuzzicano la curiosità dei ricercatori, ma esse devono stimolare anche l'interesse di quanti nelle professioni cliniche credono che il trasferimento delle conoscenze sia certamente un processo ineluttabile, ma che va sostenuto ed abbreviato da un continuo e reciproco scambio di opinioni, progetti, critiche, incoraggiamenti e finanziamenti tra ricercatori iper-specializzati (delle scienze di base) ed i professionisti iper-specializzati delle arti (speriamo presto, scienze) ludico/marziali e sanitarie. Un

incoraggiamento a proseguire l'approccio di miologia trasazionale viene dalla recente organizzazione di un gruppo di lavoro multidisciplinare all'Università di Padova, il centro di ricerca interdipartimentale di Miologia (cirMYO), che sta curando l'organizzazione del progetto di ricerca italiano Rise2-Italy, che sta estendendo ai pazienti con innervazione residuale i brillanti risultati del programma europeo RISE. Tra i risultati acquisiti dei Progetti EU RISE e Rise2-Italy vi sono l'organizzazione della cirMYO-BANK, una banca unica al mondo di biopsie prelevate da muscoli umani denervati e del data-base delle relative analisi morfometriche di microscopia ottica ed elettronica, l'ideazione e la messa a punto di nuove metodiche di *imaging* muscolare per la determinazione fine della composizione tessutale mediante Color CT scan [21] e 3D Color CT scan [12-14] e lo sviluppo dell'Ecomiografia Funzionale ultrasonografica che consente di monitorare non invasivamente spessori, ecogenicità, caratteristiche di contrattilità e di perfusione del tessuto muscolare scheletrico nel corso di terapie farmacologiche o chirurgiche e di percorsi riabilitativi fisioterapici [7,33,37,39].

Corresponding Author

Ugo Carraro. Laboratory of Translational Myology, Interdepartmental Research Center of Myology, University of Padova, Viale G. Colombo 3, 35121 Padova, Italy E-mail: ugo.carraro@unipd.it

References

- [1] Adami N, Biral D, Corbianco S, Zampieri S, Carraro U, Kern H. The fiber types of severely atrophic muscle fibers with nuclear clumps of human 5-year LMN denervated muscle. *Basic Applied Myology* 2009; 19: 225-228.
- [2] Ashley Z, Salmons S, Boncompagni S, Protasi F, Russold M, Lanmuller H, Mayr W, Sutherland H, Jarvis JC. Effects of chronic electrical stimulation on long-term denervated muscles of the rabbit hind limb. *J Muscle Res Cell Motil* 2007; 28: 203-217.
- [3] Ashley Z, Sutherland H, Lanmuller H, Russold MF, Unger E, Bijak M, Mayr W, Boncompagni S, Protasi F, Salmons S, Jarvis JC. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C440-451.
- [4] Ashley Z, Sutherland H, Russold MF, Lanmüller H, Mayr W, Jarvis JC, Salmons S. Therapeutic stimulation of denervated muscles: the influence of pattern. *Muscle Nerve* 2008; 38: 875-886.
- [5] Bijak M, Rakos M, Hofer C, Mayr W, Strohhofer M, Raschka D, Kern H. Stimulation parameter optimization for FES supported standing up and walking in SCI patients. *Artif Organs*. 2005; 29: 220-223.
- [6] Biral D, Kern H, Adami N, Boncompagni S, Protasi F, Carraro U. Atrophy-resistant fibers in permanent peripheral denervation of human skeletal muscle. *Neurol Res*. 2008; 30: 137-144.
- [7] Bizzarini E, Zampa A, Malisan C, Pinzini C, Di Benedetto P, Kern H, Carraro U. Epidemiology and clinical management of Conus-Cauda Syndrome and flaccid paraplegia in Friuli Venezia Giulia: Data of the Spinal Unit of Udine. *Basic Appl Myol* 2009; 19: 163-167.
- [8] Boncompagni S, Kern H, Rossini K, Mayr W, Carraro U, Protasi F. Structural differentiation of skeletal muscle fibers in the absence of innervation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 19339-19344.
- [9] Carraro U, Rossini K, Mayr W, Kern H. Muscle fiber regeneration in human permanent lower motoneuron denervation: relevance to safety and effectiveness of FES-training, which induces muscle recovery in SCI subjects. *Artif Organs*. 2005; 29: 187-191.
- [10] Carraro U, Morale D, Mussini I, Lucke S, Cantini M, Betto R, Catani C, Dalla Libera L, Danieli Betto D, Noventa D. Chronic denervation of rat diaphragm: maintenance of fibre heterogeneity with associated increasing uniformity of myosin isoforms. *J Cell Biol* 1985; 100: 161-74.
- [11] Carraro U, Sandri M, Zampieri S. Patologia generale del tessuto muscolare scheletrico. In: *Patologia Generale*. Pontieri GM, Russo MA, Frati L, eds. Piccin Editore, Padova, Italy, in press.
- [12] Gargiulo P, Vatnsdal B, Ingvarsson P, Knútsdóttir S, Gudmundsdóttir V, Yngvason S, Helgason T. Restoration of muscle volume and shape induced by electrical stimulation of denervated degenerated muscles: qualitative and quantitative measurement of changes in rectus femoris using computer tomography and image segmentation. *Artif Organs* 2008; 32: 609-613.
- [13] Gargiulo P, Vatnsdal B, Ingvarsson P, Knútsdóttir S, Gudmundsdóttir V, Yngvason S, Kern H, Carraro U, Helgason T. Computational methods to analyse tissue composition and structural changes in denervated muscle undergoing therapeutic electrical stimulation. *Basic Appl Myol/ European Journal of Translational Myology* 2009; 19: 157-161.
- [14] Gargiulo P, Kern H, Carraro U, Ingvarsson P, Knútsdóttir S, Gudmundsdóttir V, Yngvason S, Vatnsdal B, Helgason T. Quantitative color 3-dimensional computer tomography imaging of human long-term denervated muscle. *Neurol Res*, 2010; 32: 13-19.

Muscle pathology in LMN denervation and h-b FES

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 20 (1&2): 25-32, 2010

- [15] Graupe D, Cerrel-Bazo H, Kern H, Carraro U. Walking performance, medical outcomes and patient training in FES of innervated muscles for ambulation by thoracic-level complete paraplegics. *Neurol Res.* 2008; 30: 123-130. Review. Erratum in: *Neurol Res.* 2008; 30: 768-769.
- [16] Hofer C, Mayr W, Stöhr H, Unger E, Kern H. A stimulator for functional activation of denervated muscles. *Artif Organs* 2002; 26: 276-279.
- [17] Kauhanen MS, Salmi AM, von Boguslawsky EK, Leivo IV, Asko-Seljavaara SL. Muscle fiber diameter and muscle type distribution following free microvascular muscle transfer: A prospective study. *Microsurgery* 1998; 18: 137-144.
- [18] Kern H. Funktionelle Elektrostimulation paraplegischer Patienten. *Österr Z Phys Med* 1995; 5: 1-79
- [19] Kern H, Boncompagni S, Rossini K, Mayr W, Fanò G, Zanin ME, Podhorska-Okolow M, Protasi F, Carraro U. Long-term denervation in humans causes degeneration of both contractile and excitation-contraction coupling apparatus that can be reversed by functional electrical stimulation (FES). A role for myofiber regeneration? *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 919-31
- [20] Kern H, Carraro U. Translational Myology Focus on: Clinical Challenges of Functional Electrical Stimulation of Denervated Muscle. *Basic Appl Myol/European Journal of Translational Myology* 2008; 18: 37-100.
- [21] Kern H, Carraro U, Adami N, Biral D, Hofer C, Forstner C, Mödlin M, Vogelaue M, Boncompagni S, Paolini C, Mayr W, Protasi F, Zampieri S. Home-based Functional Electrical Stimulation (h-bFES) recovers permanently denervated muscles in paraplegic patients with complete lower motor neuron lesion. *Neurorehab Neur Rep* 2010, accepted Jan 22, 2010.
- [22] Kern H, Carraro U, Adami N, Biral D, Hofer C, Loeffler S, Vogelaue M, Mayr W, Rupp R, Zampieri S. One Year of Home-based Functional Electrical Stimulation (FES) in Complete Lower Motor Neuron Paraplegia: Recovery of Tetanic Contractility Drives the Structural Improvements of Denervated Muscle. *Neurol Res*, 2010; 32: 5-12.
- [23] Kern H, Carraro U, Biral D, Adami N, Zampieri S. Severely atrophic muscle fibers with nuclear clumps survive many years in permanently denervated human muscle. *The Open Pathology Journal* 2009; 3: 106-110.
- [24] Kern H, Hofer C, Mayr W. Protocols for Clinical Work Package of the European Project RISE. *Basic Appl Myol/European Journal of Translational Myology* 2008; 18: 39-44.
- [25] Kern H, Hofer C, Mayr W, Carraro U. European Project RISE: Partners, protocols, demography. *Basic Appl Myol / European Journal of Translational Myology* 2009; 19: 211-216.
- [26] Kern H, Hofer C, Mödlin M, Mayr W, Vindigni V, Zampieri S, Boncompagni S, Protasi F, Carraro U. Stable muscle atrophy in long-term paraplegics with complete upper motor neuron lesion from 3- to 20-year SCI. *Spinal Cord.* 2008; 46: 293-304. Epub 2007 Oct 23.
- [27] Kern H, Rossini K, Carraro U, Mayr W, Vogelaue M, Hoellwarth U, Hofer C. Muscle biopsies show that FES of denervated muscles reverses human muscle degeneration from permanent spinal motoneuron lesion. *J Rehabil Res Dev.* 2005; 42(Suppl 1): 43-53.
- [28] Kern H, Salmons S, Mayr W, Rossini K, Carraro U. Recovery of long-term denervated human muscles induced by electrical stimulation. *Muscle Nerve* 2005; 31: 98-101.
- [29] Lapalombella R, Kern H, Adami N, Biral D, Zampieri S, Scordari A, di Tullio S, Marini M. Persistence of regenerative myogenesis in spite of down-regulation of activity-dependent genes in long-term denervated rat muscle. *Neurol Res.* 2008; 30: 197-206.
- [30] Mayr W, Bijak M, Rafolt D, Sauermann S, Unger E, Lanmüller H. Basic design and construction of the Vienna FES implants: existing solutions and prospects for new generations of implants. *Med Eng Phys* 2001; 23: 53-60.
- [31] Mödlin M, Forstner C, Hofer C, Mayr W, Richter W, Carraro U, Protasi F, Kern H. Electrical stimulation of denervated muscles: first results of a clinical study. *Artif Organs* 2005; 29: 203-206.
- [32] Mussini I, Favaro G, Carraro U. Maturation, dystrophic changes and the continuous production of fibers in skeletal muscle regenerating in the absence of nerve. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987; 46: 315-31.
- [33] Rossato E, Marziali A, Carraro U, Zampieri S, Carniel D, Stramare R, Kern H, Masiero S, Ferraro C. Rise2-Italy Project: Muscle FES after peripheral nerve lesion. *Basic Appl Myol* 2009; 19: 169-172.
- [34] Rossini K, Zanin ME, Podhorska-Okolow M, Carraro U. To stage and quantify regenerative myogenesis in human long-term permanent denervated muscle. *Basic Appl Myol* 2002; 12: 277-286.
- [35] Sferrazza R, Vindigni V, Adami N, Carraro U, Mazzoleni F. Myofiber regeneration in a denervated human muscle 3.5 years after post-

Muscle pathology in LMN denervation and h-b FES

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 20 (1&2): 25-32, 2010

- traumatic free flap reconstruction. *Basic Appl Myol* 17: 137-139, 2007
- [36] Squecco R, Carraro U, Kern H, Pond A, Adami N, Biral D, Vindigni V, Boncompagni S, Pietrangelo T, Bosco G, Fanò G, Marini M, Abruzzo PM, Germinarlo E, Danieli-Betto D, Protasi F, Francini F, Zampieri S: A sub-population of rat muscle fibers maintains an assessable excitation-contraction coupling mechanism after long-standing denervation, despite lost contractility. *J Neuropath Ex Neurol* 2009 Nov 12. [Epub ahead of print] PMID: 19915489
- [37] Stramare R, Martino L, Rossato E, Zanato R, Masiero S, Carraro U. Functional Echo Myography (Ultra Sonography) of denervated/reinnervating muscle. *Basic Appl Myol* 2009; 19: 273.
- [38] Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, Elliot JL, Bassel-Duby R, Sanes JR, Olson EN. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* 2009; 326: 1549-54.
- [39] Zanato R. Ecomiografia funzionale del muscolo denervato: risultati preliminari. M.D. Thesis, University of Padova, Italy. 2009. pp. 1-44.