



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

**INOSINA PROMOVE A REGENERAÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS
LESÃO POR TRANSECÇÃO E REPARO DE NERVO ISQUIÁTICO COM TUBO DE
POLI ÁCIDO LÁTICO**

Fellipe Soares dos Santos Cardoso

Rio de Janeiro

Setembro/2024



Fellipe Soares dos Santos Cardoso

**INOSINA PROMOVE A REGENERAÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS
LESÃO POR TRANSECÇÃO E REPARO DE NERVO ISQUIÁTICO COM TUBO DE
POLI ÁCIDO LÁTICO**

**Tese submetida ao Programa de
Pós-graduação em Anatomia
Patológica, Faculdade de Medicina, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro
como parte dos requisitos necessários
à obtenção do título de Doutor em
Ciências.**

Orientadora: Dra Fernanda Martins de Almeida Maia

Rio de Janeiro

Setembro/2024

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

S319i Soares dos Santos Cardoso, Fellipe
INOSINA PROMOVE A REGENERAÇÃO E RECUPERAÇÃO
FUNCIONAL APÓS LESÃO POR TRANSECÇÃO E REPARO DE
NERVO ISQUIÁTICO COM TUBO DE POLI ÁCIDO LÁTICO /
Fellipe Soares dos Santos Cardoso. -- Rio de
Janeiro, 2024.
103 f.

Orientador: Fernanda Martins de Almeida Maia.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós
Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), 2024.

1. Inosina . 2. Reparo de nervo. 3. Regeneração.
4. Tubulização. 5. Recuperação funcional. I. Martins
de Almeida Maia, Fernanda , orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fellipe Soares dos Santos Cardoso

INOSINA PROMOVE A REGENERAÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS
LESÃO POR TRANSECÇÃO E REPARO DE NERVO ISQUIÁTICO COM TUBO DE
POLI ÁCIDO LÁTICO

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em
Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte
dos requisitos necessários à obtenção do título de
Doutor

Aprovada em: _____

Dra. Fernanda Martins de Almeida (UFRJ) (Presidente)

Dra Juliana Ferreira Vasques (UFRJ) (Membro interno)

Dra Marcia Cury El Cheik (UFRJ) (Membro interno)

Dra Fernanda de Mello e Souza Valente Gubert (UFRJ) (Membro Externo)

Dr Bruno de Siqueira Mietto (UFJF) (Membro externo)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta e indireta de muitas pessoas.

Em primeiro lugar agradeço a Deus por tudo! Os caminhos até essa conquista foram guiados por Ele.

Aos meus amados pais, Rosa Cardoso e Ricardo Cardoso, a vocês o meu eterno agradecimento. Sem vocês, nada disso seria possível. Os pais são o porto seguro dos filhos. O local de refúgio, de amor e carinho. E em seu aconchego sempre o encontrei. Agradeço sobretudo, o investimento a mim dedicado, para que pudesse obter uma educação de qualidade. Hoje comemoramos mais uma conquista. Sem o apoio de vocês, essa jornada acadêmica seria muito mais pesada.

À minha amada esposa, Beatrice Abrahão. Essa conquista tem seu toque responsável. Ter escolhido você para ser minha companheira para vida foi uma das mais lindas dádivas do destino. Você conhece cada aspecto da minha pessoa, me incentiva e anima quando tudo parece que vai dar errado. Me coloca de volta nos trilhos quando estou fora dele. E acima de tudo, comemora ao meu lado cada passo que trilho para o sucesso. Sem você em minha vida, não seria tão completo. Obrigado por partilhar da sua vida comigo, por me tornar um ser humano cada vez melhor e por tornar leve e divertida essa jornada da vida. Em breve, nosso amor irá gerar frutos aos quais nos orgulharemos enormemente. Aliás, nosso primeiro fruto se chama Luli Maria e é nosso denguinho. Amo você, minha vida.

Aos meus sogros Elizabeth Abrahão e Paulo Abrahão, entusiastas, apoiadores e meus pais na lei. Agradeço a vocês por me terem como um filho, por me aconselharem e por sempre estarem torcendo pelo meu sucesso. Ter ao meu lado vocês, torna essa caminhada suave.

Dedico a conquista desse título à minha família. Somos só amor, amizade e cumplicidade. Após a conquista desse título, vamos comemorar muito, naquela bagunça que só a gente sabe fazer. AMO VOCÊS.

Agradeço *in memoriam*, meus avós Maria Henriqueta, Antônio dos Santos, Deolinda Cardoso e Luiz Cardoso, que hoje festejam comigo no céu mais essa conquista. Em especial vó Henriqueta, a quem sempre estive ao meu lado, espero que hoje possa a encher de orgulho. Amo muito vocês.

À minha orientadora, Professora Fernanda Almeida, essa conquista também é sua. Você é muito mais que uma orientadora. É uma grande amiga. Na verdade, você é minha mãe na ciência. Sempre uma dose de carinho e puxões de orelhas necessários. Saiba que me inspiro na professora, pesquisadora e humana fantástica que você é. Seus ensinamentos moldaram meu eu científico de hoje. Agradeço por

toda sua dedicação e paciência. Nossa parceria continuará rendendo frutos. Que venha o pós-doutorado e muitas publicações.

Que injustiça cometeria se deixasse de fora minha querida profa Ana Martinez. Que pessoa maravilhosa e arretada. Obrigado por ter me convidado lá nos meados de 2013 para seu laboratório e por ter contribuído ainda mais pela minha paixão pela ciência. Uma das minhas fontes de inspiração e incentivo para continuar crescendo nesse mundo científico e acadêmico . A você, minha eterna gratidão.

Agradeço a todos os amigos do grupo de pesquisa do laboratório de Neurodegeneração e Reparo, por toda resenha científica e não científica que temos no nosso dia a dia. Sem a presença de vocês, os dias de pesquisa no laboratório não seriam tão divertidos.

Um agradecimento especial aos amigos Tiago Taboada, Luiza Heringer, Fernanda Pestana, Guilherme Santos e Bruna Ramalho. Sem a participação e colaboração de vocês, esse trabalho não teria sido concluído.

Um agradecimento mais que especial ao professor Bruno Mietto, a quem eu devo uma parte da maturidade científica neste tempo de convivência e trocas de conhecimento. Sem que ele saiba, me inspira a ir mais além neste belo mundo da neurociência. Não poderia deixar de agradecer com imenso carinho o grande professor Henrique Mendonça, a quem tenho grande admiração. Um grande amigo, flamenguista, e que torna com sua presença, qualquer ambiente agradável e divertido.

Agradeço à professora Fernanda Gubert, pelas excelentes pontuações e críticas construtivas na qualificação desta tese e, por novamente disponibilizar do seu tempo para estar presente na defesa desta tese. Agradeço também às professoras Juliana Vasques, Marcia Cury e Bruno Pontes, por também estarem disponíveis para participar dessa fase e engrandeceram esta tese.

Um agradecimento especial à professora Katia Carneiro, pela disponibilidade de participar desta banca e também por estar sempre presente e para solucionar qualquer contratempo

Agradeço a todos os amigos que se fazem presente em minha vida, dando forças para seguir em frente.

“A menor distância entre dois pontos é a ciência”

(Adan Fernandes da Silva)

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”

(Albert Einstein)

RESUMO

CARDOSO, Fellipe. INOSINA PROMOVE A REGENERAÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS LESÃO POR TRANSECÇÃO E REPARO DE NERVO ISQUIÁTICO COM TUBO POLI ÁCIDO LÁTICO. TESE (DOUTORADO EM CIÊNCIA - ANATOMIA PATOLÓGICA), FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO, 2024

Lesões traumáticas em nervos periféricos resultam em perda parcial ou total das funções motora e sensitiva, causando consequências biopsicossociais e laborais. Após a lesão, uma série de eventos complexos iniciam-se tanto no coto proximal quanto no coto distal, a fim de possibilitar que os axônios lesados regenerem e reinervem os seus órgãos alvos. Entretanto, a gravidade da lesão é um fator limitante para a regeneração. Para que ocorra regeneração após uma lesão por transecção, é necessário que seja realizado um reparo no nervo. Em humanos, a sutura coto a coto ou a neurografia é indicada para casos nos quais o espaço entre os segmentos, após a lesão, foi inferior a um centímetro. Porém, em casos nos quais esta distância é de até cinco centímetros ou superior deve-se optar entre o uso do enxerto autólogo ou órteses tubulares compostas de materiais biodegradáveis, sendo esta última, uma opção viável, pois funcionam como um guia mecânico e bioquímico, além de diminuir formação de tecido cicatricial. No entanto, ainda assim não é suficiente para atingir recuperação total. Considerando esta questão, estratégias que estimulem ou aceleram a regeneração axonal são essenciais para a regeneração do nervo. Dessa forma, o uso da inosina se torna um potencial tratamento, devido a seus mecanismos de ação e ativação de vias que promovem a regeneração. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da inosina na regeneração do nervo isquiático, após lesão por transecção e tubulização em camundongos. Para isso, foram utilizados camundongos C57/BL6, fêmeas, com idades de 8-12 semanas, que tiveram seus nervos transecionados, permitindo um espaço de 3 cm. Para o reparo do nervo, foi utilizado o tubo de poli-ácido lático (PLA) medindo 5 cm, permitindo a sutura em 1 cm proximal e 1 cm distal. Os animais foram tratados com solução salina ou inosina via intraperitoneal 1 h após a lesão e, diariamente, ao longo da primeira semana. Foram realizadas análises funcionais previamente à lesão e, semanalmente, ao longo das oito semanas de sobrevivência. Para avaliar a função motora, foi utilizado o índice de função do isquiático (IFI) e para a função sensitiva, o teste da picada do alfinete e analgesímetro. Ao final

da sobrevivência, foi realizada a eletroneuromiografia e eutanásia dos animais. Após perfusão, os tecidos foram coletados para análises morfológicas qualitativas e quantitativas. O grupo inosina + PLA apresentou uma grande quantidade de fibras mielínicas, onde a maioria das fibras encontram-se dentro da razão-g ideal, além de apresentar uma maior imunomarcagem para NFH e MBP. As células de Schwann (CS) dos animais do grupo inosina + PLA apresentaram uma maior marcação para o receptor A2A. Além disso, o tratamento com inosina atenuou a atrofia muscular, garantiu uma maior viabilidade das junções neuromusculares e aumentou a amplitude do potencial de ação muscular composto (PAMC), latência e velocidade de condução do nervo. Por fim, estes resultados levaram a uma recuperação da função motora e sensitiva. Com esses resultados é possível concluir que o tratamento com inosina torna-se uma alternativa viável após o reparo do nervo com o tubo de PLA.

ABSTRACT

CARDOSO, Fellipe. INOSINE PROMOTES REGENERATION AND FUNCTIONAL RECOVERY AFTER SCIATIC NERVE TRANSECTION AND REPAIR USING POLY-LACTIC ACID CONDUIT IN MICE. TESE (DOUTORADO EM CIÊNCIA - ANATOMIA PATOLÓGICA), FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO, 2024

Following traumatic injuries to peripheral nerves, there is a partial or total loss of motor and sensory functions, leading to significant biopsychosocial and occupational burdens. After an injury, a series of complex events occur both in the proximal and distal stumps, to facilitate the regeneration and reinnervation of the injured axons to their target organs. However, the extent of the injury is a crucial factor that influences the potential for regeneration. Nerve repair is essential to promote regeneration after a transection injury. For gaps less than 1cm in humans, an end-to-end suture or neuroraphy can be performed. However, for gaps up to 5 cm or superior, one must choose between using autologous grafts or tubular orthosis composed of biomaterials, being the latter a viable option, serving as a mechanical and biochemical guide, besides reducing scar tissue formation. However, it may not be sufficient for achieving complete recovery. Regarding this issue, strategies for stimulating or accelerating axonal regeneration are essential for nerve regeneration. Inosine rises as a promise and potential treatment due to its action mechanisms and activation of pathways that promote regeneration. Therefore, the aim of this work is to evaluate the effects of inosine in sciatic nerve regeneration, following transection injury and tubulization in mice. Female mice, aged 8-12 weeks, had their nerves surgically transected, creating a 3 cm gap. For nerve repair, a 5 cm poly-lactic acid (PLA) tube was used, allowing for 1 cm proximal and 1 cm distal suturing. The animals received saline and inosine intraperitoneally 1 hour after injury, and then daily for the first week. Functional analyses were performed weekly for up to 8 weeks. We analyzed motor function using the sciatic functional index (SFI) and the sensory function using the pinprick and analgesimeter. At the end of the survival, we conducted electroneuromyography and the animals were euthanized. After perfusion, the tissues were harvested for further quantitative and qualitative morphological analysis. Following the injury, the inosine + PLA group exhibited a significant increase in the number of myelinated fibers, with a large amount of these fibers within the optimal g-ratio range, in addition showed increased immunostaining for

NFH and MBP, as well greater staining for the A2A receptor in the Schwann cells (CS). Moreover, the inosine treatment reduced muscular atrophy, improved the viability of neuromuscular junctions, and enhanced the amplitude of compound muscle action potential (CMAP), latency, and nerve conduction velocity. Ultimately, these findings resulted in the restoration of motor and sensory function, leading to the conclusion that inosine treatment is a promising option following nerve repair with a PLA conduit.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 O Sistema Nervoso – uma visão geral.....	20
1.2 O nervo periférico e suas estruturas.....	23
1.3 Lesões traumáticas do Sistema Nervoso Periférico.....	28
1.4 Degeneração Walleriana.....	30
1.4.1 As fases da Degeneração Walleriana - do trauma ao colapso axonal.....	31
1.4.2 Célula de Schwann de Reparo - da reprogramação gênica às bandas de Büngner.....	35
1.5 Regeneração.....	40
1.5.1 Eventos no corpo celular e no axônio proximal.....	40
1.5.2 Regeneração através do axônio distal.....	42
1.6 Estratégias de reparo após lesão por transecção.....	43
1.7 Terapias moleculares – o uso da inosina.....	47
1.7.1 Inosina: formação e mecanismos de ação.....	47
1.7.2 – Uso da inosina em lesões nervosas.....	50
2. OBJETIVOS.....	52
2.1 Objetivo geral.....	52
2.2 Objetivos específicos.....	52
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 Procedimento cirúrgico + reparo do nervo:.....	53
3.2 Preparo e administração dos tratamentos:.....	54
3.3 Perfusão e obtenção dos tecidos:.....	54
3.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET):.....	55
3.5 Análise morfométrica:.....	56
3.6 Microscopia Óptica (MO):.....	57
3.7 Imuno-histoquímica de fluorescência (IHQ).....	57
3.8 Análise do músculo gastrocnêmio.....	58
3.8.1 Peso seco.....	58
3.8.2 Análise da morfologia das junções neuromusculares (JNM).....	59
3.9 Testes funcionais:.....	59
3.9.1 Índice de Função do Isquiático.....	59
3.9.2 Teste da picada do alfinete.....	60
3.9.3 Analgesímetro.....	61
3.10 Eletroneuromiografia.....	62
3.11 Análise estatística.....	63
4. RESULTADOS.....	63
4.1 Análise histológica e morfométrica de nervos isquiáticos regenerados após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina.....	63
4.2 Imuno-histoquímica para NFH após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina... 67	
4.3 Imuno-histoquímica para A2AR e MBP após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina.....	68

4.4 Avaliação do peso seco do músculo gastrocnêmio após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina.....	70
4.5 Morfologia e quantificação das JNM.....	71
4.6 Avaliação da recuperação da função motora e sensitiva após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina.....	72
4.7 Avaliação da amplitude do PAMC, latência do potencial de ação e velocidade de condução do nervo após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina.....	75
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Divisão anatômica do SN.....	21
Figura 2: Representação das células presentes no SN.....	23
Figura 3: Eletromicrografia de um nervo. Corte ultrafino transversal de um nervo isquiático.....	24
Figura 4: Linhagens das CS e determinação entre fenótipo mielínico e Remak.....	26
Figura 5: Eletromicrografia de uma fibra nervosa mielínica.....	27
Figura 6: Estruturas do nervo periférico.....	28
Figura 7: Os tipos de lesões classificadas por graus.....	30
Figura 8: Eventos da DAA.....	34
Figura 9: Eventos da fase iniciadora da degeneração Walleriana.....	34
Figura 10: Resumo dos eventos degenerativos.....	35
Figura 11: Reprogramação das CS.....	37
Figura 12: Formação dos ovóides de mielina e mielínofagia.....	38
Figura 13: Sinais transmitidos para o corpo celular.....	42
Figura 14: Tipos de reparo de nervo após neurotmele – grau V.....	46
Figura 15: Mecanismos da ativação do receptor A2A.....	49
Figura 16: Cadeia de formação e degradação da inosina.....	50
Figura 17: Desenho experimental da tese.....	53
Figura 18: Esquema ilustrativo da tubulização e dos três segmentos do nervo.....	55
Figura 19: Imagem representativa de um nervo regenerado e dos 5 campos fotografados.....	56
Figura 20: Representação esquemática da razão-g.....	57
Figura 21: Esquema da execução do teste, marcação da pata e fórmula IFI.....	60
Figura 22: Esquema da área de estímulo doloroso e pontuação do teste pinprick....	61
Figura 23: Aparelho Von Frey digital e esquema de realização do teste.....	62
Figura 24: Esquema representativo da realização da eletroneuromiografia e parâmetros analisados.....	63
Figura 25: Análise quantitativa do número total de fibras mielínicas e de vasos sanguíneos.....	65
Figura 26: Morfologia e ultraestrutura de nervos em regeneração.....	66
Figura 27: Análise morfométrica dos nervos isquiáticos.....	67
Figura 28: Imunomarcagem para NFH.....	68
Figura 29: Imuno-histoquímica para A2AR e MBP.....	69
Figura 30: Análise do peso seco do músculo gastrocnêmio.....	71
Figura 31: Análise das JNM nos músculos gastrocnêmios.....	72
Figura 32: Análise da recuperação motora.....	73
Figura 33: Análise da recuperação da sensibilidade tátil.....	74
Figura 34: Análise da recuperação da sensibilidade dolorosa.....	75
Figura 35: Análise da amplitude e latência do PAMC e VCN.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificações dos anticorpos primários utilizados.....	58
Tabela 2: Especificações dos anticorpos secundários utilizados.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1 - receptor de adenosina (ou P1) 1

A2A - receptor de adenosina (ou P1) 2a

A2B - receptor de adenosina (ou P1) 2b

A3 – receptor de adenosina (ou P1) 3

ATP - do inglês “*Adenosine Triphosphate*”

BDNF – do inglês “*Brain-derived neurotrophic factor*”

Ca⁺² – Íon de cálcio

cAMP – do inglês “*Cyclic adenosine monophosphate*”

CCL2 – do inglês “*C-C motif chemokine ligand 2*”

CREB – do inglês “*cAMP responsive element binding protein 1*”

CS - Células de Schwann

CSF1 - do inglês “*colony stimulating factor 1*”

CSi – Célula de Schwann imatura

CSp – Célula de Schwann prematura

CSpm – Célula de Schwann pró-mielínica

DAA – Degeneração axonal aguda

DLK – do inglês “*Dual leucine zipper kinase*”

E12/13 – Dia embrionário 12/13

E15/16 – Dia embrionário 15/16

ENMG – Eletroneuromiografia

ErbB – do inglês “*erythroblastic leukemia viral oncogene homolog (avian)*”

ERK – do inglês “*Extracellular signal-regulated kinases*”

GAP-43 - do inglês “*Growth Associated Protein-43*”

GDNF – do inglês “*Glial cell line-derived neurotrophic factor*”

GFAP – do inglês “*Glial fibrillary acidic protein*”

GM-CSF – do inglês “*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*”

IFI - Índice de Função do Isquiático

IFN- γ – do inglês “*Interferon gamma*”

IL 4 – do inglês “*Interleukin 4*”

IL10 – do inglês “*Interleukin 10*”

IL-1 α – do inglês “*Interleukin 1 alpha*”

IL-1 β – do inglês “*Interleukin 1 beta*”

IL6 – do inglês “*Interleukine 6*”

ISL - Incisura de Schmidt-Lanterman

JNK – do inglês “*cJun N-terminal kinase*”

JNM – Junção neuromuscular

Krox 20 (EGR2) – do inglês “*Early growth response protein 2*”

LIF – do inglês “*Leukemia inhibitory factor*”

LIMK 1 – do inglês “*LIM domain kinase 1*”

LPS – do inglês “*Lipopolysaccharide*”

M0 – Macrófago indiferenciado

M1 – Linhagem de macrófago pró-inflamatório

M2 – Linhagem de macrófago anti-inflamatório

MAG – do inglês “*Myelin associated glycoprotein*”

MAP1 – do inglês “*Microtubule-associated protein 1*”

MAPK – do inglês “*Mitogen-associated protein kinase*”

MBP – do inglês “*Myelin basic protein*”

MEK – do inglês “*Mitogen-associated protein kinase kinase kinase*”

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MO – Microscopia óptica

Mst3b - do inglês “*Mammalian sterile 20-like kinase-3b*”

mTORC1 – do inglês “*Mammalian target of rapamycin complex 1*”

Na⁺ - Íon de sódio

NAD – do inglês “*Nicotinamide adenine dinucleotide*”

NADPH – do inglês “*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*”

NCAM – do inglês “*Neural cell adhesion molecule 1*”

NFH – do inglês “*Neurofilament high chain*”

NGF – do inglês “*Nerve growth factor*”

NGS - do inglês “*Normal Goat Serum*”

NMN – do inglês “*Nicotinamide mononucleotide*”

NMNAT 2 - do inglês “*Nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase*”

NO – Óxido nítrico

NOGO – do inglês “*Neurite outgrowth inhibitor*”

Notch 1 – do inglês “*Neurogenic locus notch homolog protein 1*”

NRG1 – do inglês “*Neuregulin 1*”

NRG1-III – do inglês “*Neuregulin 1- type III*”

NT3 – do inglês “*Neurotrophin 3*”

Oct 6 (POU3F1) – do inglês “*POU domain, class 3 transcription factor 1*”

P0 – do inglês “*Myelin protein zero*”

P1R – Receptor de purina 1 ou receptor de adenosina 1

p75NTR – do inglês “*Nerve growth factor receptor*”

PAMC - Potencial de Ação Muscular Composto

PBS - do inglês “*Phosphate-Buffered Saline*”

PFA - Paraformaldeído

PKA – do inglês “*cAMP-dependent protein kinase*”

PL - do inglês “*Print Length*”

PLA – do inglês “*Poly(lactic) acid*”

PMP22 – do inglês “*Peripheral myelin protein 22*”

RAG's – do inglês “*Regeneration associated genes*”

ROS – do inglês “*Reactive oxygen species*”

SARM1 – do inglês “*Sterile alpha and TIR motif containing 1*”

SGC 10 – do inglês “*Stathmin 2*”

SN – Sistema nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

Sox 10 – do inglês “*Sex determining region Y-box transcription factor 10*”

Sox 2 – do inglês “*Sex determining region Y-box transcription factor 2*”

Tau – do inglês “*Tubulin-associated unit*”

TGFβ – do inglês “*Tumor growth factor beta*”

TNFα - do inglês “*Tumor necrosis factor alpha*”

TrKA – do inglês “*Tyrosine kinase receptor A*”

TrKB - do inglês “*Tyrosine kinase receptor B*”

UPS – do inglês “*Ubiquitin-proteasome system*”

VCN – Velocidade de condução do nervo

VEGF – do inglês “*Vascular endothelial growth factor*”

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Sistema Nervoso – uma visão geral

O sistema nervoso (SN) é um sistema complexo e organizado, subdividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) (Figura 1). O SNC é responsável por receber e processar estímulos provenientes do meio externo e/ou interno a fim de gerar respostas motoras. É composto pelo encéfalo, que é subdividido em cérebro, cerebelo e tronco encefálico - mesencéfalo, ponte e bulbo - e pela medula espinal. Por serem estruturas nobres, estão acomodados e protegidos por arcabouços ósseos. O encéfalo, pelo crânio e a medula espinal pela coluna vertebral, formada pelas vértebras cervicais (C1 a C7), torácicas (T1 a T12), lombares (L1 a L5) e sacrais (S1 a S5). Ademais, são envoltas pelas meninges – pia-máter, aracnoide e dura-máter – o que confere a essas estruturas proteção contra choques e traumas (KANDEL *et al.*, 2014; MARTINEZ, ALLODI E UZIEL, 2014). Já o SNP é o responsável por transmitir informações eferentes (comando gerado no SNC para os músculos esqueléticos) e aferentes (dos receptores sensitivos localizados em todo o corpo para o SNC). É composto pelos nervos periféricos, terminações nervosas e por neurônios especializados, presentes nos gânglios. (KANDEL *et al.*, 2014; MARTINEZ, ALLODI E UZIEL, 2014).

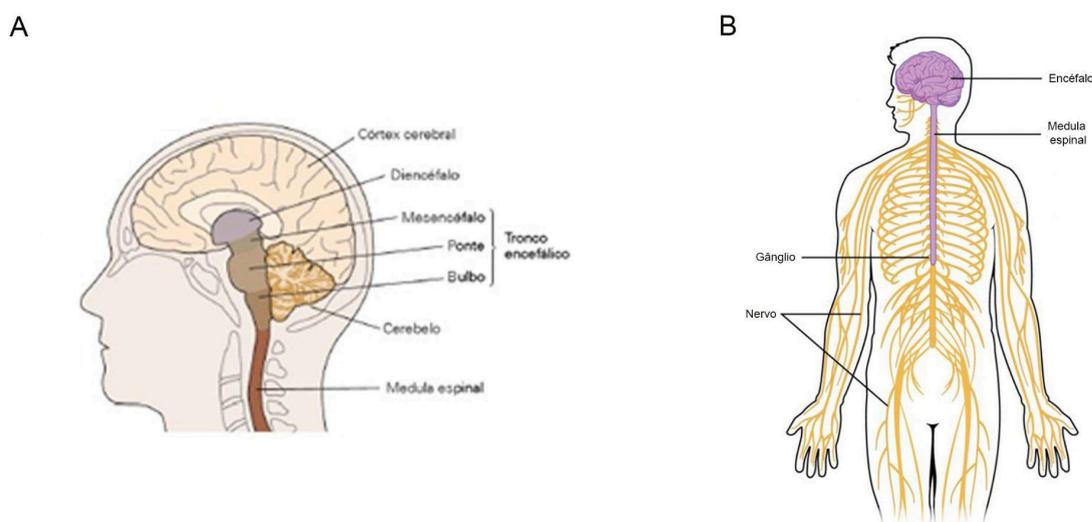


Figura 1: Divisão anatômica do SN. A) representação do SNC e suas divisões evidenciadas; B) representação do SNP (em amarelo) e também SNC (em lilás). A Retirado de KANDEL, 2014; B retirado e adaptado de <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter>.

O SN, devido à sua importância, está presente ao longo de todo o corpo, sendo constituído por neurônios e células da glia (Figura 2). O neurônio, célula quimicamente e eletricamente excitável, é responsável por receber e transmitir os estímulos intrínsecos e extrínsecos ao longo de todo o corpo. Os neurônios são constituídos por 3 partes bem definidas: 1) Corpo celular; 2) dendritos; 3) axônios; (KANDEL *et al.*, 2014; MARTINEZ, CORREA E ALLODI, 2014). O corpo celular é o centro metabólico e trófico do neurônio, e no seu citosol, podemos encontrar suas principais organelas: núcleo, retículos endoplasmático rugoso e liso, complexo de Golgi e mitocôndrias. Do corpo celular se originam duas estruturas: os dendritos e os axônios. Os dendritos, conhecidos pelo seu formato semelhante a uma árvore, são responsáveis por receber impulsos provenientes de outros neurônios e podem formar sinapses com dendritos ou axônios de outros neurônios (KANDEL *et al.*, 2014; MARTINEZ, CORREA E ALLODI, 2014). Já o axônio, estrutura única originada a partir do cone de implantação no neurônio, podendo se estender a depender da espécie por 1 metro, é o segmento responsável pela transmissão do potencial de ação a uma velocidade de até 100 m/s. Além disso, também é responsável pelo transporte de organelas, neurotransmissores, proteínas do citoesqueleto, entre outras (KANDEL *et al.*, 2014; MARTINEZ, CORREA E ALLODI, 2014). Axônios que se originam e se distanciam de um neurônio em particular e transmitem o impulso nervoso e formam sinapses com músculos, glândulas ou órgãos, são chamados de eferentes. Já aqueles que transmitem os impulsos provenientes de músculos, glândulas ou de órgãos formam sinapses com um neurônio, são chamados de aferentes (MARTINEZ, CORREA E ALLODI, 2014). Próximo de sua região terminal, o axônio se ramifica e forma regiões especializadas pela transmissão do sinal, conhecida como sinapses. As sinapses ocorrem entre neurônios, dendritos, axônios e músculos. A sinapse entre neurônio e músculo, é conhecida como “placa motora” ou junção neuromuscular (MARTINEZ, CORREA E ALLODI, 2014; LIU E CHAKKALAKAL, 2018).

Além dos neurônios, as células da glia, anteriormente descritas apenas como células de suporte e mielinização, também compõem o SN. Atualmente sabemos que elas exercem papéis muito mais importantes para a função adequada dos neurônios, entre elas, nutrição, regulação da concentração extracelular de íons e neurotransmissores (proteção), sustentação e participação na formação da barreira

hematoencefálica. A glia do SNP é constituída pela glia entérica (sistema nervoso entérico), células satélites (presentes nos gânglios da raiz dorsal) e células de Schwann (CS) (Figura 2) (MARTINEZ, CORREA E ALLODI, 2014).

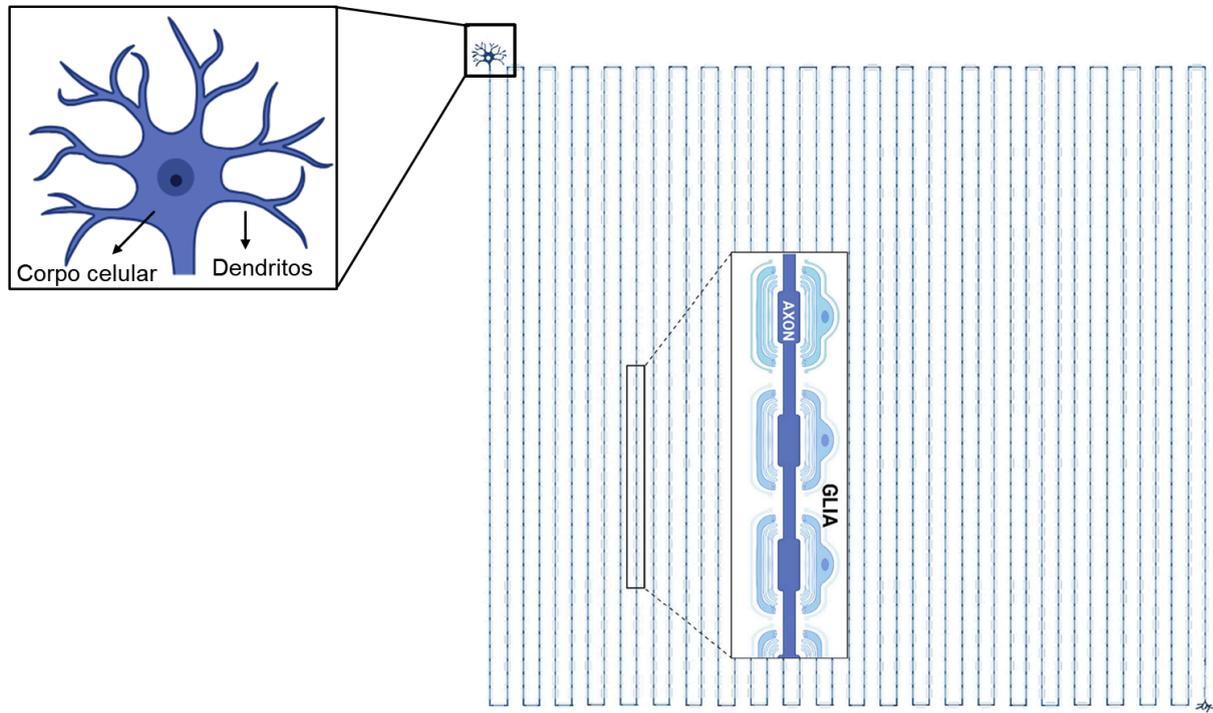


Figura 2: Representação das células presentes no SN. Podemos ver no canto superior esquerdo, o corpo celular do neurônio e seus dendritos. Ao longo de toda imagem, podemos ver o axônio e sua ampla extensão. E por fim, no canto inferior direito, temos a região do axônio terminal, responsável pela formação das sinapses. Note, que na área destacada, podemos ver o axônio e a mielina formada pela CS, glia presente na porção axonal do SNP. Esquema retirado de BABETTO E BEIROWSKI, 2022.

1.2 O nervo periférico e suas estruturas

O nervo periférico, principal componente do SNP, é o responsável por conduzir impulsos nervosos entre o SNC e os músculos. É composto por feixes de fibras, prolongamentos axonais do corpo celular dos neurônios, que ficam localizados no corno anterior ou no corno lateral da medula espinal (neurônios motores) ou no gânglio da raiz dorsal (neurônios sensitivos). Essas fibras são divididas em fibras miélicas e amielínicas. (Figura 3) (KIDD, OHNO E TRAPP, 2013).

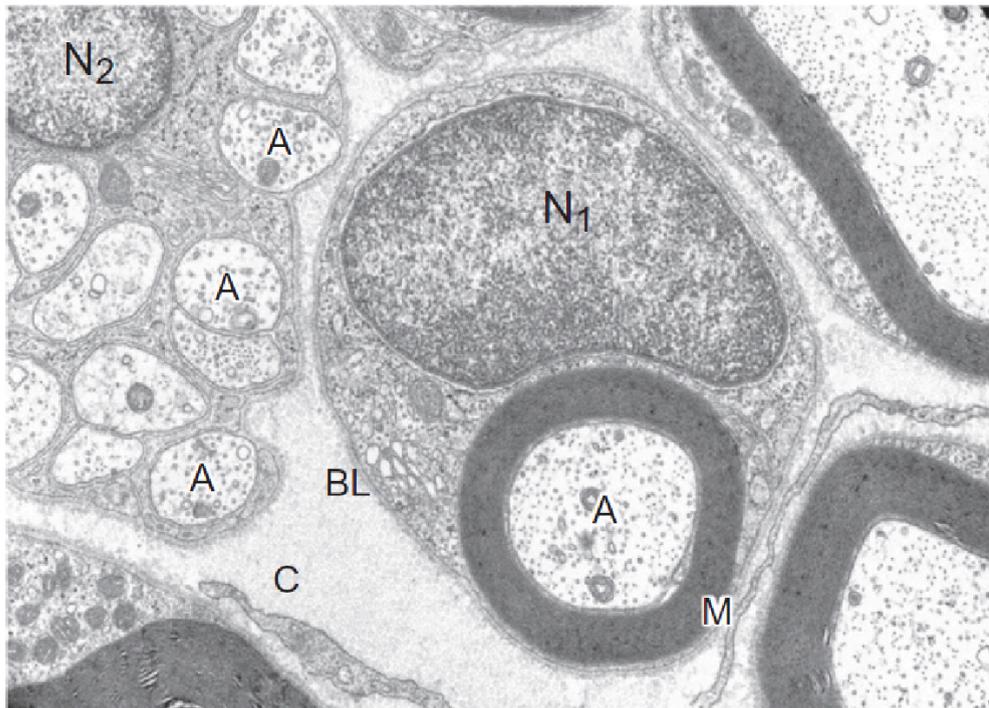


Figura 3: Eletromicrografia de um nervo. Corte ultrafino transversal de um nervo isquiático. Note a relação íntima entre a CS e um único axônio (N1) e uma única CS envolvendo múltiplos axônios (N2). A – axônio; BL – lâmina basal; M – mielina; C – fibras de colágeno. Retirado de KIDD, OHNO E TRAPP 2013.

As CS se originam de células provenientes da crista neural, que estão em migração para o nervo durante o desenvolvimento. Em roedores, destacando nesse paragrafo os camundongos, nos dias embrionários 12/13 (E12/13), as células provenientes da crista neural dão origem aos precursores das CS (CSp), através da ativação de alguns fatores de transcrição como Sox 10 e notch (FLEDRICH *et al.*, 2019). Nessa fase, as CSp ainda estão em migração e seus prolongamentos achatados e sem lâmina basal se associam a diversos axônios compactados, pela ausência de matriz extracelular. Esta associação ocorre através da interação entre a NRG1 (do inglês *neuregulin 1*), presente na membrana axoplasmática do axônio e os receptores ErbB 2/3 (do inglês *erythroblastic leukemia viral oncogene homolog (avian)*), presentes nas CS (NAVE E SALZER, 2006; JESSEN, MIRSKY E LLOYD, 2015). Esta ligação, desencadeia mecanismos cruciais para as subsequentes linhagens de CS e seu destino. Além disso, as CSp suportam o crescimento dos axônios através da expressão de fatores de crescimento como NGF (do inglês, *nerve growth factor*), BDNF (do inglês *brain derived neurotrophic factor*), GDNF (do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*) e NT3 (do inglês *neurotrophin 3*)

(KIDD, OHNO E TRAPP, 2013). Em torno dos dias embrionários 15/16 (E 15/16), observa-se a presença de espaço extracelular contendo fibras de colágeno, fibroblastos e vasos sanguíneos. Este período marca a diferenciação para o fenótipo de CS imatura (CSi), já se observado presença de lâmina basal (JESSEN, MIRSKY E LLOYD, 2015; FLEDRICH et al., 2019). Nesta fase, através da ligação da NRG1 do tipo III aos receptores ErbB2/3, define-se o destino das CSi (NAVE E SALZER, 2006). Axônios que apresentam em sua membrana axoplasmática grande quantidades de NRG1 (apresentando diâmetro maior que 1 μ m), são separados em um contato 1:1 com as CSi através de um processo conhecido como “radial sorting” (NAVE E SALZER, 2006). Este processo dá à CS origem ao fenótipo CS pró mielínica (CSpm), levando a super expressão de fatores de transcrição cruciais para mielinização, como Krox 20, Sox 10 e Oct 6, e consequente aumento na expressão de proteínas de mielina como MBP, P0 e PMP22 s (KIDD, OHNO E TRAPP, 2013; FLEDRICH et al., 2019). A partir desse momento, até o nascimento, a CSpm dará origem à CS mielínica. Além disso, a espessura da mielina será definida pela quantidade de NRG1-tipo III presente na membrana axonal (NAVE E SALZER, 2006), e através da via NRG1-III/ErbB, ocorre o controle da biossíntese de colesterol nas CS (QUINTES *et al.*, 2010). Este processo, dá origem às fibras mielinicas (KIDD, OHNO E TRAPP, 2013). Em contrapartida, axônios que apresentam pequena quantidade de NRG1 do tipo III, (apresentando diâmetro menor que 1 μ m), não são separados em um contato 1:1 com as CS. Neste caso, uma população destes axônios são envolvidas por uma única CS, conhecida como CS de Remak, e formam os feixes de Remak (NAVE E SALZER, 2006). Este processo, dá origem às fibras amielinicas. A linhagem da CS até os fenótipos mielínicos e de Remak, estão representadas na figura 4.

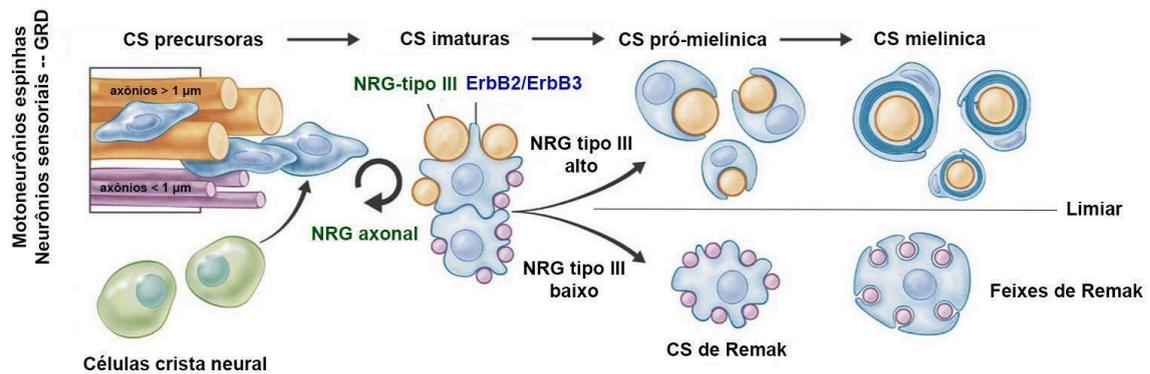


Figura 4: Diferenciação da CS entre fenótipo mielínico e Remak. Representação esquemática das linhagens das SC. Note que a definição da mielinização ou não dos axônios pelas CS será de acordo com a ligação NRG-tipo III/ErbB2/ErbB3 e com a quantidade presente de NRG-tipo III na superfície axonal. GRD - gânglio da raiz dorsal. Retirado e adaptado de NAVE E SALZER, 2006.

A bainha de mielina, no SNP, é formada pela justaposição de camadas lipoproteicas, formadas pelas CS e envolvem o axônio de forma não contínua, ou seja, uma região axonal é coberta por ela, enquanto outra fica desnuda, com exposição do axolema. Esta área desnuda é rica em canais de sódio dependentes de voltagem e é denominada nodo de Ranvier. Já a região delimitada por dois nodos de Ranvier consecutivos (área recoberta pela mielina) é chamada de internodo. Além disso, podemos observar que as lamelas de mielina de cada internodo terminam consecutivamente no internodo, onde existe contato entre a membrana interna da CS e do axolema subjacente. Esta região é conhecida como paranodo. Esta organização permite que impulso nervoso chegue rapidamente até a célula-alvo, pois não se propaga continuamente pela membrana do axônio, mas sim “salta” diretamente de um nodo de Ranvier para o outro (KANDEL *et al.*, 2014; MARTINEZ, ALLODI E UZIEL, 2014). A respeito da região do internodo é importante ressaltar que sua maior parte é formada por mielina compactada, com a estrutura lamelar clássica, linha intraperiódica e linha densa principal (Figura 5, A). Porém algumas regiões apresentam mielina não compactada, formada pela membrana adaxonal das CS que se opõe a superfície do axônio e pela membrana abaxonal da CS, que é a membrana da CS voltada para o microambiente endoneural extracelular. A esta região é dado o nome de incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL), região esta de suma importância, por ser a área onde axônio e CS realizam trocas

de substratos vitais para a sobrevivência de ambos (Figura 5, B - seta vermelha) (KIDD, OHNO E TRAPP, 2013).

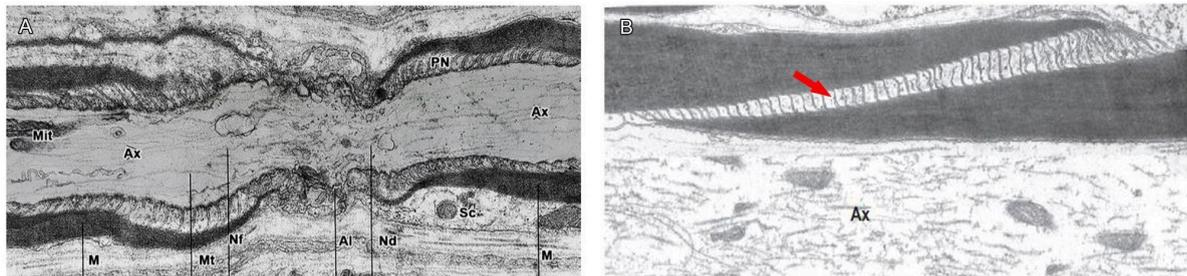


Figura 5: Eletromicrografia de uma fibra nervosa mielinica. A) No corte longitudinal, podemos observar o axônio (Ax), envolto pelas camadas da bainha de mielina (M), formada pelo citoplasma das células de Schwann (CS), e no nodo de Ranvier ausência da mesma, resultando na exposição do axolema (Al), além da região paranodal (PN). Note também os elementos de citoesqueleto, neurofilamentos (Nf) e microtúbulos (Mt), além de um perfil mitocondrial (Mit). B) Corte longitudinal de uma fibra mielinica evidenciando no internodo, a região da ISL (seta vermelha)

Além do conjunto de fibras mielinicas e amielinicas, o nervo é formado por três tipos de tecido conjuntivo ricos em colágeno, disposto em camadas, orientadas longitudinalmente e paralelas ao tronco do nervo, conferindo elasticidade e portanto resistência à tração e estiramentos ocorridos durante o movimento dos membros, impedindo rompimento de suas estruturas. Ainda, apresentam complacência, o que permite em aumento de pressão, não oclusão do aporte sanguíneo local (ZOCHODNE, 2008). Estes tecidos conjuntivos do nervo são denominados de epineuro, perineuro e endoneuro (Figura 6). A camada mais externa é o epineuro. De espessura bem variável, é constituído por tecido conjuntivo denso não-modelado, composto predominantemente por fibras de colágeno tipo I, que reveste e preenche os espaços entre os feixes das fibras nervosas. Contém também fibras elásticas, fibroblastos, macrófagos residentes, entre outros. Possui propriedades elásticas, conferindo resistência à tração, além de apresentar um rico aporte vascular, apresentando um fluxo sanguíneo duas a três vezes maior que o das camadas mais internas (ZOCHODNE, 2008). O perineuro é a camada intermediária que envolve cada fascículo. É composto por células achatadas, chamadas células perineurais, que são unidas por junções oclusivas (zona oclusiva) e por junções do tipo *gap* (zona aderente) formando camadas separadas por colágenos do tipo IV. Esta conformação constitui uma barreira à passagem de macromoléculas: a barreira hemato-nervosa. Essa barreira forma uma espécie de cápsula protetora ao redor de

cada fascículo nervoso, impedindo o acesso de eventuais substâncias tóxicas à sua estrutura íntima. É considerado o maior sítio de permeabilidade seletiva do nervo periférico, preservando o microambiente endoneural e atuando como um mecanismo de defesa contra agentes agressivos (ZOCHODNE, 2008). A camada mais interna e mais importante de tecido conjuntivo é o endoneuro, responsável por envolver cada axônio e suas CS associadas. É constituído por fibrilas de colágeno do tipo III, fibroblastos, macrófagos, entre outros. Seus capilares derivam de vasos provenientes dos nervos, revestidos por células endoteliais contínuas e unidas por junções de oclusão, fazendo parte da barreira hemato-nervosa (ZOCHODNE, 2008).

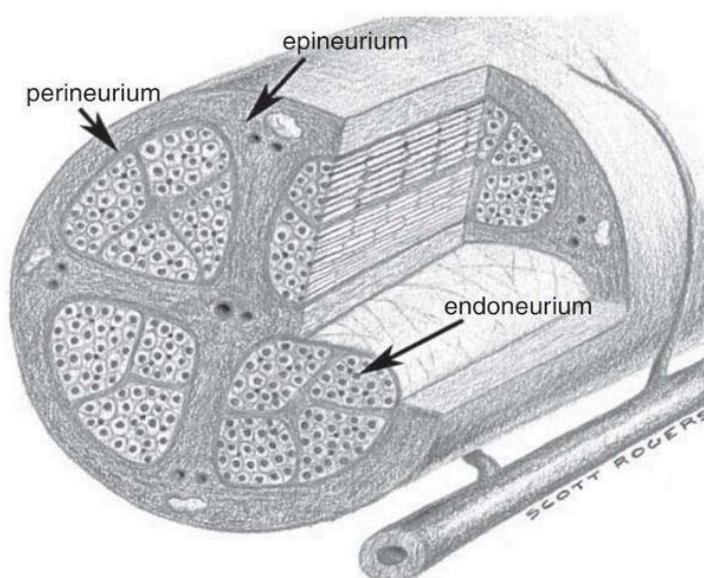


Figura 6: Estruturas do nervo periférico. Representação esquemática de um nervo e seus envoltórios de tecido conjuntivo. As setas apontam para cada componente, sendo eles epineuro (*epineurium*), perineuro (*perineurium*) e endoneuro (*endoneurium*). Note a presença de vasos sanguíneos no epineuro, proveniente de vasos sanguíneos periféricos. Retirado de ZOCHODNE, 2008

1.3 Lesões traumáticas do Sistema Nervoso Periférico

Lesões em nervos periféricos são muito comuns e variam de acordo com o grau e severidade. Devido às suas características elásticas, os nervos apresentam resistência à estiramentos. Porém, apesar de complacentes, são menos tolerantes às compressões (MANKAVI, IBRAHIM E WANG, 2023). Por serem estruturas desprovidas de proteção óssea, estão mais suscetíveis a traumas, sendo estes a forma mais comum de lesões aos nervos periféricos. Comumente, as situações de trauma ocorrem após acidentes automobilísticos (sendo a causa mais comum

acidentes de motos), cortes profundos com objetos perfurocortantes, por projéteis de armas de fogo ou após o parto em recém natos. As lesões de nervos periféricos podem ser classificadas como neuropraxia, axonotmese e neurotmese, como proposta por Seddon em 1975, ou por uma classificação numérica mais ampla (I-V), como descrita por Sunderland (1951). Dessa forma, podemos classificar as lesões em cinco graus de acordo com a estrutura acometida. São eles: neuropraxia (grau I), axonotmese (grau II) e neurotmese (graus III, IV e V) (Figura 7).

Na neuropraxia (**grau I**) ocorre uma perda de função temporária com preservação da continuidade do axônio, causada por uma interrupção do transporte retrógrado e anterógrado axonal, ocasionada principalmente por estresse mecânico como compressões sustentadas, porém também podem ser causadas por calor, frio ou choques elétricos e é comumente associada a algum grau de isquemia. Em alguns casos mais severos, podem ocorrer anormalidades mielínicas locais ou até mesmo desmielinização segmentar (DEUMENS *et al.*, 2010).

Na axonotmese (**grau II**) ocorre um dano adicional ao axônio e sua bainha de mielina, porém sem comprometer a integridade dos tecidos conjuntivos (endoneuro, perineuro e epineuro) estruturais. Esta lesão ocorre após uma compressão ou pinçamento do nervo, por alguma estrutura óssea ou muscular, e cursa com a desintegração axonal e mielínica, eventos esses observados na degeneração Walleriana. Por preservar o tecido conjuntivo estrutural, a regeneração ocorre de forma espontânea, não sendo necessária nenhuma intervenção para tal (DEUMENS *et al.*, 2010). Porém, o grau de regeneração poderá ser limitado ao considerar os seguintes fatos: 1) Local do alvo à lesão (tempo para atingir alvo x declínio de potencial regenerativo neuronal/potencial de reparo CS) (JESSEN E MIRSKY, 2019); 2) Comprimento do membro (junto com o tópico 1, irá definir o tempo necessário para se atingir o alvo).

Na neurotmese (**graus III, IV e V**), temos um comprometimento axonal e dos tecidos conjuntivos. No **grau III**, ocorre além do comprometimento axonal, uma ruptura do endoneuro. Podem ocorrer após um estiramento leve do nervo e a regeneração/recuperação pode ser completa ou não. Isto dependerá do grau de fibrose intrafascicular, o que em certo ponto, “mimetizaria” o endoneuro lesado. No **grau IV**, além do comprometimento axonal e do endoneuro, ocorre uma ruptura também do perineuro. Podem ocorrer após um estiramento moderado do nervo e em

sua maioria, torna-se necessário a intervenção cirúrgica para correção, porém há casos em que a regeneração/recuperação pode ocorrer de forma espontânea. Esse tipo de lesão também pode evoluir com a formação de neuromas, o que dificultaria e/ou impossibilitaria a regeneração, levando a um comprometimento funcional permanente. No **grau V**, ocorre um comprometimento axonal e de todos os tecidos conjuntivos, tornando esse tipo o mais grave e com a necessidade de correção cirúrgica para atingir algum grau de regeneração/recuperação funcional. Ocorre após um estiramento severo ou mais comumente cortes profundos com materiais perfuro cortantes ou projéteis de armas de fogo (DEUMENS *et al.*, 2010).

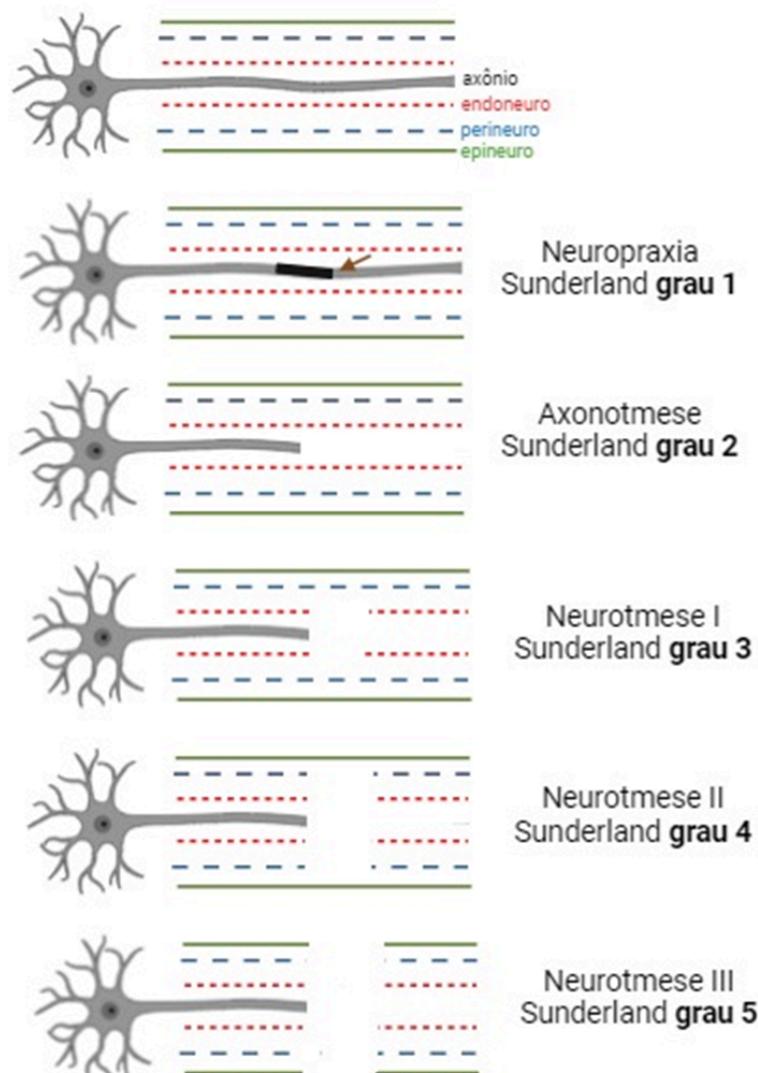


Figura 7: Os tipos de lesões classificadas por graus. Representação esquemática dos tipos de lesões, considerando a classificação proposta por Sunderland (graus I a V) e Seddon (neuropraxia, axonotmese e neurotmese). Note que a seta em vermelho, no grau I (neuropraxia) representa um bloqueio transitório no transporte axonal. Adaptado de DEUMENS *et al.*, 2010

1.4 Degeneração Walleriana

A degeneração Walleriana é uma resposta axonal estruturada e complexa, que ocorre no coto distal do axônio desconectado do seu corpo celular. Esta resposta, considerada como protetora (CHANG *et al.*, 2016), tem a finalidade de criar um microambiente favorável ao crescimento axonal, para os eventos regenerativos subsequentes (CHEN, YU E STRICKLAND, 2007; ALLODI, UDINA E NAVARRO, 2012; GEDEN E DESHMUKH, 2016; CANTY *et al.*, 2020). Em nervos periféricos, estas respostas ocorrem sobretudo após lesões traumáticas, seja por compressão ou transecção, mas também em doenças neurodegenerativas, como por exemplo Guillian Barré e Charcot-Marie Tooth (WANG, MEDRESS E BARRES, 2012; MIETTO, MOSTACADA E MARTINEZ, 2015; CHANG *et al.*, 2016; WONG, BABETTO E BEIROWSKI, 2017). A primeira observação foi realizada por Augustus Waller (1850), que descreveu em seu trabalho as alterações que ocorriam nos axônios após uma lesão. Desde então esses eventos e respostas moleculares são amplamente estudados, com objetivo de ampliar o conceito e desenvolver possíveis estratégias de tratamento.

Neste tópico serão abordados os eventos degenerativos que ocorrem após a lesão por transecção do nervo periférico.

1.4.1 As fases da Degeneração Walleriana - do trauma ao colapso axonal

Após transecção do nervo periférico, o axônio é dividido em 2 segmentos com características morfológicas e moleculares distintas, sendo eles: 1- proximal, ligado ao corpo celular, o qual representa os processos regenerativos; 2 – distal, desconectado do corpo celular, o qual representa os processos degenerativos e posteriormente recebe o axônio em regeneração (GIROUARD *et al.*, 2018; CANTY *et al.*, 2020). É importante frisar que estes eventos ocorrem de forma simultânea, porém é conhecido que o sucesso da degeneração no segmento distal do axônio, influencia diretamente a habilidade do segmento proximal do axônio de regenerar (KERSCHENSTEINER *et al.*, 2005; GIROUARD *et al.*, 2018).

Logo após o trauma, inicia-se imediatamente no axônio distal os eventos correspondentes à degeneração Walleriana. Este evento é compreendido por 3 fases morfológicamente distintas, sendo elas: 1) Fase inicial – degeneração axonal aguda; 2) Fase latente do axônio distal ou iniciadora; 3) Fase executora (WANG, MEDRESS E BARRES, 2012).

A primeira fase da degeneração Walleriana, conhecida como degeneração axonal aguda (DAA), representa uma rápida e bem estruturada fragmentação de axônios, que se estende entre 100 a ~400 μm do local da lesão. Esta fase em particular, afeta tanto o segmento distal, quanto o proximal e tem duração em torno de 5 a 60 minutos imediatamente após a lesão (KERSCHENSTEINER *et al.*, 2005; KNÖFERLE *et al.*, 2010; WANG, MEDRESS E BARRES, 2012). Esta fase é caracterizada pela rápida fragmentação axonal e pela formação de bulbos distróficos nos terminais de cada coto, em decorrência do acúmulo de organelas axoplasmáticas, devido a interrupção dos transportes anterógrado e retrógrado (WANG, MEDRESS E BARRES, 2012).

O principal mecanismo responsável pelo início da DAA é o influxo de íons Ca^{+2} tanto através da quebra do axolema no local da lesão, quanto pelos seus respectivos canais, levando à ativação das calpaínas, proteases sensíveis ao Ca^{+2} (KNÖFERLE *et al.*, 2010; WANG, MEDRESS E BARRES, 2012). Este mecanismo é o principal responsável pela quebra inicial dos componentes do citoesqueleto axonal, como neurofilamentos e componentes associados ao microtúbulo, como a espectrina e tubulina (BEIROWSKI *et al.*, 2010; WANG, MEDRESS E BARRES, 2012). Algumas considerações podem ser feitas a respeito da importância da DAA. No coto proximal, após a proteólise de neurofilamentos e microtúbulos, mediados pela ativação das calpaínas, ocorre a remodelação do citoesqueleto. Este mecanismo favorece a formação dos cones de crescimento e a consequente extensão de novos neuritos (WANG, MEDRESS E BARRES, 2012; GIROUARD *et al.*, 2018).

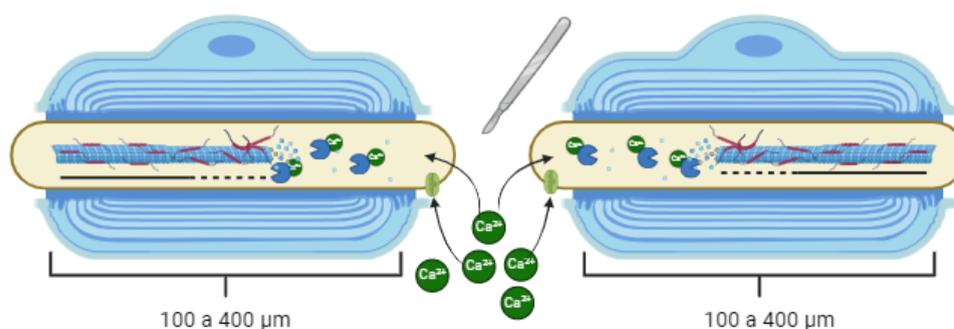


Figura 8: Eventos da DAA. Transecção do nervo e divisão do axônio em proximal e distal. Após a exposição do axolema, temos o influxo de íons de Ca^{+2} tanto pela exposição da membrana ao meio extracelular, quanto pelos canais de Ca^{+2} . Após o aumento dos íons de Ca^{+2} no meio intracelular, temos a ativação das calpaínas e a consequente degradação dos neurofilamentos (linha preta pontilhada) e a despolimerização dos microtubulos, pela proteólise das proteínas Tau e MAP-1, ao longo de 100 até 400 μm tanto no axônio proximal como no distal. Adaptado de WANG, MEDRESS E BARRES, 2012

Após os eventos iniciais ocorridos na DAA, o axônio distal se encontra em uma fase de latência, conservando propriedades morfológicas intactas, além de sua capacidade de conduzir potencial de ação até 48 horas depois da lesão, até que ocorra uma falência progressiva na transmissão neuromuscular (MOLDOVAN, ALVAREZ E KRARUP, 2009; WANG, MEDRESS E BARRES, 2012). Porém, similar à DAA, a elevação dos níveis de Ca^{+2} e a subsequente ativação das calpaínas também estão relacionados aos eventos que serão abordados nessa fase da degeneração Walleriana. Contudo, diferente da DAA, nesta fase o aumento nos níveis de íons de Ca^{+2} ocorre ao longo de todo o axônio distal. Porém, os terminais transecionados da membrana axonal ao nível da lesão são rapidamente selados por um mecanismo de fusão de vesículas, mediado por Ca^{+2} (WANG, MEDRESS E BARRES, 2012). Logo, este influxo inicial não é suficiente para deflagrar uma resposta degenerativa abrupta ao longo de todo o coto distal, demonstrando portanto que outro mecanismo emerge como responsável por essa elevação substancial nos níveis de Ca^{+2} .

Após o trauma e a consequente desconexão com o corpo celular, entre 12 e 24 horas o axônio distal sofre diversas consequências da ausência do transporte anterógrado. Uma dessas consequências é a ausência do fluxo contínuo da NMNAT 2, uma enzima produzida no corpo celular, transportada ao longo de todo o axônio e responsável por catalisar a síntese da NAD^{+} , coenzima capaz de produzir ATP em diversas fases do metabolismo energético, através do mecanismo de “Redox” – captura de íons H^{+} e consequente conversão de NAD^{+} para NADPH - (GILLEY E COLEMAN, 2010; CONFORTI, GILLEY E COLEMAN, 2014; GERDTS *et al.*, 2016; ALEXANDRIS E KOLIATSOS, 2023). A manutenção dos níveis de NAD^{+} axonal é fundamental para sua sobrevivência e integridade, visto que este regula os níveis de Ca^{+2} no axoplasma, através do armazenamento destes no retículo endoplasmático e mitocôndria (WANG, MEDRESS E BARRES, 2012), além de manter a atividade do canais de Ca^{+2} e dos trocadores Ca^{+2} - ATPases e $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (YANG *et al.*, 2015). Com

a interrupção do fluxo axoplasmático após a lesão, três grandes problemas se apresentam para a progressão da Degeneração Walleriana: 1) Redução nos níveis de NMNAT 2 decorrente da ausência de “reabastecimento” proveniente do corpo celular, problema este que é agravado pela sua baixa meia vida (WANG, MEDRESS E BARRES, 2012); 2) Aumento substancial nos níveis de NMN no axoplasma, devido ao acúmulo levando a este se ligar à SARM 1, NADase responsável pela hidrólise de NAD^{+2} , ocasionando em sua ativação e interrompendo diversos mecanismos dependentes de energia via NAD (LORETO *et al.*, 2023; CZECH *et al.*, 2023). Além disso, a SARM 1 ocasiona a ativação de uma série de MAPKs, sendo a via DLK/JNK envolvida nesse processo. Esta ativação potencializa a redução nos níveis energéticos, levando à progressão da degeneração (MILLER *et al.*, 2009); 3) Depleção energética, causada pelos baixos níveis de NAD^{+} , ocasionando em disfunção e alteração na permeabilidade das mitocôndrias, que em conjunto com o retículo axoplasmático, acarreta na liberação de Ca^{+2} no axoplasma (VILLEGAS *et al.*, 2014). Além disso, há uma desregulação dos trocadores de Na^{+} - Ca^{+2} , além da degradação da subunidade 1.2 α dos canais de Na^{+} pela atividade das calpaínas. Dessa forma, estas alterações provocam o um influxo dos íons Ca^{+2} para o axoplasma (MA, 2013) (Figura 9).

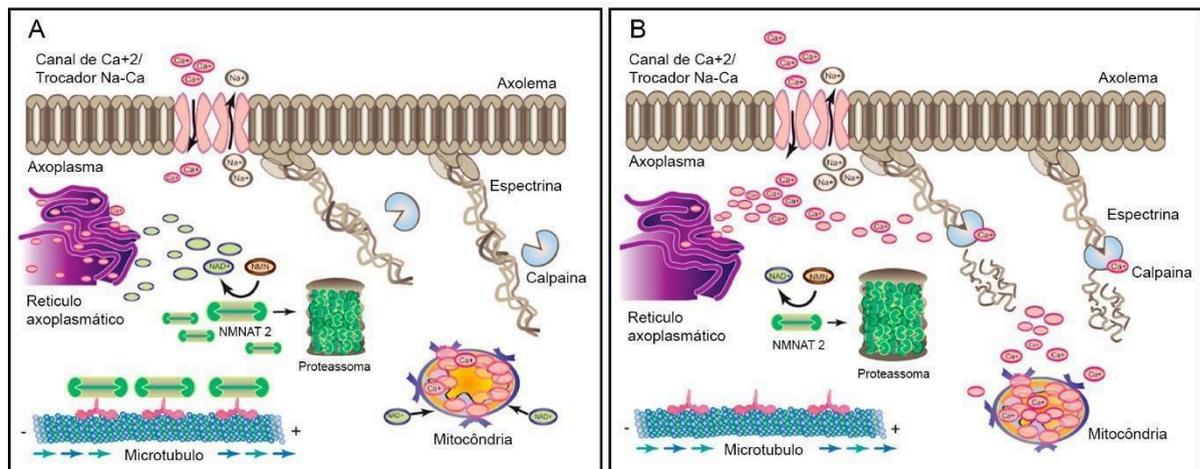


Figura 9: Eventos da fase iniciadora da degeneração Walleriana. A) Microambiente axonal íntegro devido a homeostase pela manutenção dos níveis de NMNAT 2 através do transporte axonal anterógrado, garantindo assim um nível sustentado de NAD⁺ e mantendo os níveis baixos de Ca²⁺ no axoplasma, decorrente da reserva desses íons no retículo endoplasmático e mitocôndrias, além do funcionamento normal do trocador de Na⁺-Ca²⁺. B) Perda do suporte de NMNAT 2 resultando na redução gradual do seu nível, devido a sua degradação pelas proteassomas e a ausência de "reposição" pelo transporte axonal anterógrado. Dessa forma, ocorre uma redução significativa nos níveis de NAD⁺, acarretando na disfunção dos trocadores Na⁺-Ca²⁺, além da liberação de íons de Ca²⁺ presentes nas mitocôndrias e retículo endoplasmático, levando a subsequente ativação das calpaínas. Adaptado de WANG, MEDRESS E BARRES, 2012

Este déficit energético retratado anteriormente cria no microambiente axonal um problema, pois os neurônios são particularmente vulneráveis a déficits energéticos, pois: 1) Necessitam de uma alta demanda de ATP (4.7×10^9 moléculas de ATP/segundo no repouso); 2) Não possuem um estoque energético; 3) Se estendem por longas distâncias, sendo as porções mais distais do axônio, muito distante do corpo celular (BABETTO E BEIROWSKI, 2022). Tendo essa problemática da falência da bioenergética axonal como destaque, entre 24 e 48 horas após a lesão temos o início da terceira e última fase da degeneração Walleriana (WANG, MEDRESS E BARRES, 2012). Esta fase é caracterizada por um abrupto e assíncrono colapso axonal, dado ao aumento dos níveis de íons Ca²⁺ livres no axoplasma, acarretando a ativação das calpaínas (WANG, MEDRESS E BARRES, 2012; MA, 2013) e consequente proteólise de neurofilamentos de cadeia leve, média e pesada. Porém, as calpaínas também participam da despolimerização e consequente desmontagem dos microtúbulos, através da proteólise das proteínas de estabilização dos microtúbulos TAU e MAP-1 (MA, 2013). Contudo, a fragmentação destes microtúbulos despolimerizados, ocorre através do mecanismo conhecido como sistema ubiquitina-proteassoma (do inglês, *ubiquitin proteasome*

system - UPS). O funcionamento da UPS decorrerá da ligação de uma ubiquitina (E3 ou E4 ligase) a esses fragmentos de microtúbulo, com posterior direcionamento a uma proteassoma, levando a sua consequente degradação (Figura 10) (EHLERS, 2004). Todos os mecanismos aqui apresentados foram estudados a partir da descoberta de um animal mutante, onde os axônios lesados permaneciam intactos por até 14 dias. Este animal foi denominado como Ola mouse ou Wlds mouse (do inglês *Wallerian like degeneration slow*) (LUNN *et al.*, 1989; PERRY *et al.*, 1990).

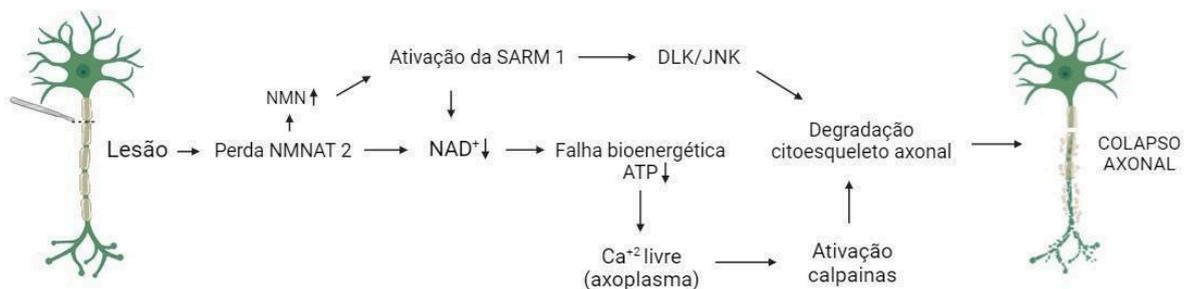


Figura 10: Resumo dos eventos degenerativos. Esquema representando os eventos cruciais desencadeados após a lesão, partindo da fase iniciadora da degeneração Walleriana e tendo até atingir seu desfecho na fase executora, o colapso axonal. Adaptado de GERDTS *et al.*, 2016

1.4.2 Célula de Schwann de Reparo - da reprogramação gênica às bandas de Büngner

Em concomitância aos eventos degenerativos no axônio distal, uma mudança crucial ocorre nas CS. Devido à sua íntima relação metabólica e trófica com os axônios, as CS são capazes de detectar, no nível da lesão e em regiões mais distantes, tanto as perturbações no microambiente axonal, quanto a perda do contato com o axônio, no coto distal (MIETTO, MOSTACADA E MARTINEZ, 2015; WONG, BABETTO E BEIROWSKI, 2017; SARDELLA-SILVA, MIETTO E RIBEIRO-RESENDE, 2021), sendo este último o principal mecanismo responsável por ativar o mecanismo de reprogramação gênica tanto nas CS de Remak, quanto leva a uma alteração em seu fenótipo, acarretando em um aumento de duas a três vezes em seu tamanho, permitindo-as assim formar longos e ininterruptos tratos, tornando este perfil altamente comprometido com a regeneração (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2017). Porém, este perfil de reparo também exerce papéis vitais para a sequência dos eventos degenerativos (JESSEN E MIRSKY, 2016; WONG, BABETTO E BEIROWSKI, 2017). Para exemplificar os eventos que

ocorrem no reparo, serão abordadas as alterações gênicas observadas no perfil mielínico, pois as respostas nesse fenótipo são mais radicais do que as no fenótipo de Remak (JESSEN E MIRSKY, 2022).

Logo após a percepção das alterações no axônio, as CS mielinicas passam por um processo de reprogramação gênica, que tem como característica principal a elevação do fator de transcrição c-Jun (ARTHUR-FARRAJ *et al.*, 2012). Após a lesão, é amplamente demonstrado um aumento nos níveis de NRG1 e seu receptor ErbB nas CS, com implicação direta no aumento da c-Jun e a consequente ativação do fenótipo de reparo (KIM, MINDOS E PARKINSON, 2013; NOCERA E JACOB, 2020), através das seguintes vias: 1) JNK/c-Jun; 2) MEK/Erk; 3) p38MAPK (NAPOLI *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012; BOERBOOM *et al.*, 2017; JESSEN E MIRSKY, 2022).

Após a elevação nos níveis da c-Jun e o consequente início do fenótipo de reparo nas CS, algumas respostas para a sequência dos eventos degenerativos são desencadeadas (PARKINSON *et al.*, 2008). Conforme os níveis da c-Jun vão se elevando nas CS, a mielinização e sustentação da mielina pelas CS é suprimida, devido ao decréscimo substancial nos níveis de expressão de fatores de transcrição pró-mielínicos como Sox 10 e Krox 20, impactando negativamente na transcrição de genes associados a mielina como MBP, P0, MAG, PMP 22 e periaxina, além de reduzir os níveis de cAMP. Por outro lado, a expressão de fatores associados ao reparo como Sox 2, p75NTR, GFAP e NCAM é induzida (Figura 11) (KIM, MINDOS E PARKINSON, 2013; JESSEN E MIRSKY, 2016).

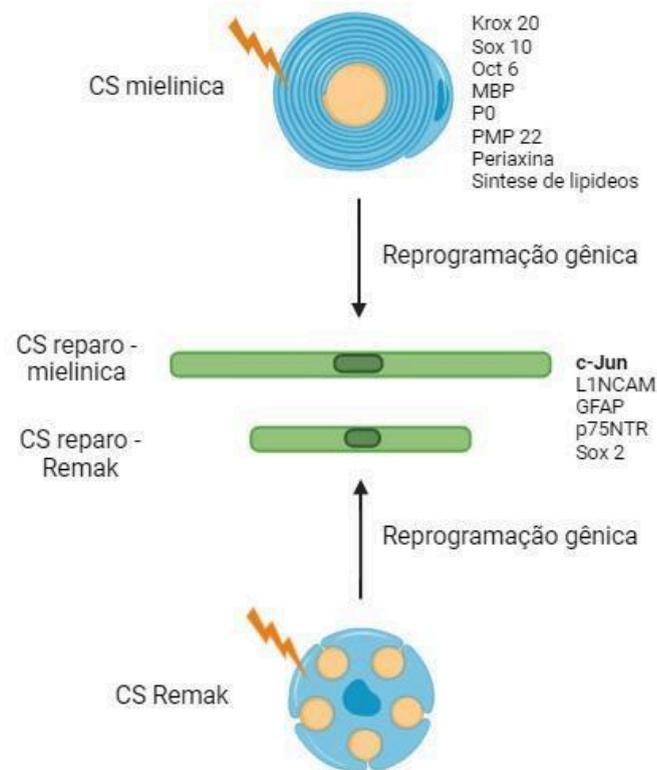


Figura 11: Reprogramação das CS. Após lesão, ambas as CS mielínicas e de Remak se reprogramam em um fenótipo de reparo, além da alteração na expressão de genes associados à mielina, em genes associados ao reparo. Note a diferença de tamanho entre as CS de reparo provenientes das CS mielínicas e de Remak. Adaptada de JESSEN E MIRSKY, 2019.

Após estas alterações marcantes no perfil genético e fenotípico, uma das primeiras respostas da CS é o início da autofagia (comumente denominado mielínofagia) das proteínas e lipídios da mielina danificados pela lesão, dado que seu acúmulo inibe o processo de regeneração. Este processo regulado pela via da JNK/c-Jun, é necessário para que ocorra nas CS um aumento de Atg7, LC3-I e LC3-II, fatores associados a autofagia, necessários para degradação dos restos de mielina (inserto - figura 12) (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2015). Ao passo que a mielínofagia se inicia nas CS, ocorre uma reestruturação do seu citoesqueleto em torno das ISL, através da polimerização de novas fibras de F-actina, além da quebra e acúmulo de E-cadherina em seu citoplasma, acarretando em um arredondamento entre duas ISL isolando por “estrangulamento” uma área do axônio, para que ocorra os respectivos eventos da mielínofagia (JUNG *et al.*, 2011; PARK E FELTRI, 2011; JANG *et al.*, 2016). Esse evento é responsável pela formação dos conhecidos ovóides de mielina. Estes remetem às observações feitas pela pesquisadora Liliana Lubinska, que investigou essa formação estereotípica ao longo de todo o axônio

distal, primeiramente em fibras de menor calibre e posteriormente em fibras de maior calibre (Figura 12) (LUBIŃSKA, 1977).

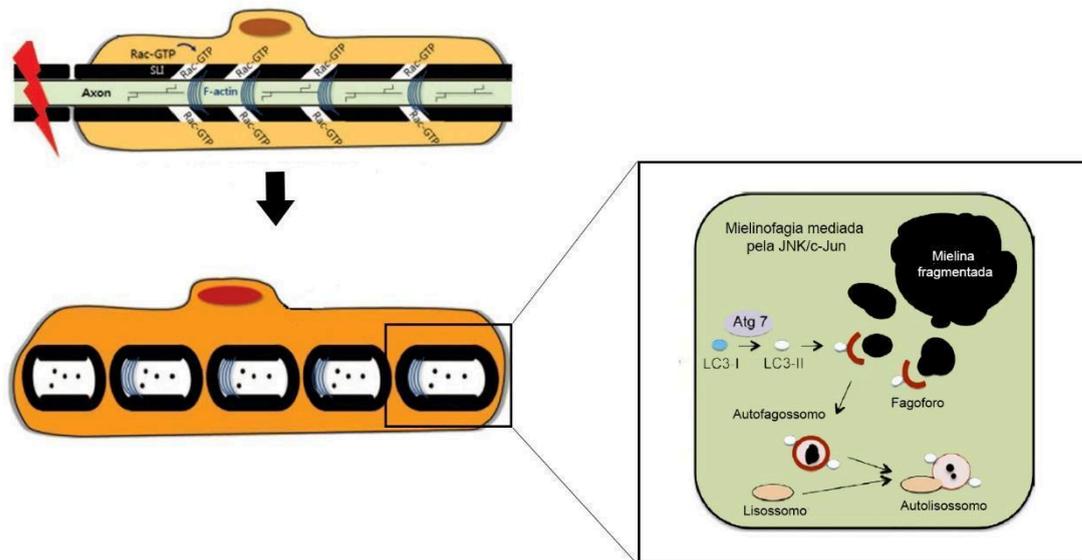


Figura 12: Formação dos ovóides de mielina e mielinofagia. Esquema representando a formação dos ovóides de mielina, e a polimerização da F-actina ao longo das ISL. Após a formação dos ovóides, foram destacados os mecanismos da mielinofagia e a consequente degradação da mielina. Adaptado de PARK; FELTRI, 2012 e GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2015

Logo após as CS de reparo iniciarem o processo de mielinofagia através da formação dos ovóides de mielina, os macrófagos residentes são mobilizados a responder aos insultos ocorridos, após a expressão e secreção de CSF1 pelas CS de reparo e fibroblastos. Após a mobilização e consequente ativação, esses macrófagos residentes proliferam e em conjunto com as CS de reparo, participam na fagocitose de debris de mielina e de restos de axônios degradados (MUELLER *et al.*, 2003; MSHEIK *et al.*, 2022). Um trabalho recente demonstrou a relação entre os macrófagos residentes e as CS, na limpeza dos debris de mielina. A depleção desta população de macrófagos ativou a autofagia nas CS. Dessa forma, este trabalho demonstrou a importância dos macrófagos residentes na fagocitose dos debris de mielina, visto que a ausência deles foi capaz de ativar a autofagia nas CS (WEIß *et al.*, 2023). Porém, devido a baixa quantidade desta população no microambiente, a despeito de proliferação (WEIß *et al.*, 2023) e seu baixo poder fagocítico (SHEN *et al.*, 2000), as CS de reparo recrutam para o microambiente degenerativo diretamente da corrente sanguínea, monócitos/macrófagos para intensificar o

processo de limpeza do microambiente (STOLL *et al.*, 1989). Para tal, as CS de reparo liberam no microambiente algumas citocinas e quimiocinas, como CCL2, LIF, IL-1 α e IL-1 β , que são as principais responsáveis pela infiltração de monócitos/macrófagos da corrente sanguínea. A infiltração inicia-se de 2 a 3 dias após a lesão e tem seu pico com 7 dias (CHEN, PIAO E BONALDO, 2015). Após o recrutamento, a proporção entre os monócitos/macrófagos recrutados da corrente sanguínea e os macrófagos residentes é de 3:1, tornando assim, essa limpeza do microambiente mais eficaz (ZIGMOND E ECHEVARRIA, 2019). A atuação em conjunto entre as CS e as populações de macrófagos na limpeza do microambiente axonal é de vital importância para a conclusão dos eventos degenerativos e sequência da regeneração no coto distal. A mielina do SNP, assim como a mielina do SNC, também apresenta em sua estrutura inibidores à regeneração, tornando a persistência de restos de mielina degradada no microambiente em um impeditivo ao crescimento axonal (VARGAS *et al.*, 2010).

Após infiltrar no microambiente do coto distal em degeneração, estes macrófagos (M0), irão responder aos estímulos do microambiente e irão se polarizar em dois perfis: 1) ativação clássica em macrófagos M1 e responsável por respostas pró-inflamatórias; 2) ativação alternativa, em macrófagos M2 e responsável por respostas anti-inflamatórias (CHEN, PIAO E BONALDO, 2015). Os macrófagos M1 são polarizados pela LPS, IFN γ , TNF α e GM-CSF e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, além de ROS e NO, devido à ativação da INOS e metaloproteinases (MMP's). Esse perfil é responsável pela degradação e fagocitose da mielina (CHEN, PIAO E BONALDO, 2015; ZIGMOND E ECHEVARRIA, 2019). Em contraste, citocinas como IL-4 e IL-10 são responsáveis por polarizar os macrófagos M0 ou M1, no perfil M2. Esses macrófagos liberam no ambiente citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , componentes da matriz extracelular e VEGF. Estes macrófagos estão relacionados com os eventos regenerativos e sendo associados com reparo tecidual, além de formação de novos vasos sanguíneos, que auxiliam no alívio da hipoxia no local da lesão, além de permitir que as CS guiem os axônios em regeneração (CHEN, PIAO E BONALDO, 2015; ZIGMOND E ECHEVARRIA, 2019). Por fim, os macrófagos degradam os restos de mielina em colesterol e em outras moléculas de lipídios. Estes, são transportados novamente para as CS formarem a bainha de mielina durante a remielinização (WU *et al.*, 2024).

Após a conclusão do processo de limpeza do microambiente, as CS de reparo (Remak e mielínica) alinham-se na sua própria lâmina basal criando tratos ininterruptos, que serão cruciais para guiar o axônio em regeneração ao longo de todo o coto distal até seu alvo. Este alinhamento é conhecido como Bandas de Büngner (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2017).

1.5 Regeneração

Concomitante e interdependente aos eventos degenerativos que ocorrem na porção distal do nervo, ocorre na porção proximal, o processo de regeneração. Diferente do SNC, que apresenta uma regeneração axonal abortiva, dado à característica inibitória do microambiente e de uma inflamação prolongada (MIETTO, MOSTACADA E MARTINEZ, 2015), o SNP apresenta um potencial regenerativo, devido à presença das CS e seus papéis cruciais durante o processo degenerativo, além da grande taxa de infiltração de macrófagos, que juntos são responsáveis pela limpeza do microambiente. Além disso, as CS se proliferam na sua própria lâmina basal e formam as bandas de Büngner, e junto a células não-neuronais e macrófagos, produzem fatores neurotróficos, proteínas de matriz extracelular e moléculas de adesão e seus receptores. Dessa forma, os axônios em regeneração provenientes do coto proximal são guiados através do coto distal até seu alvo, para que possam reestabelecer novas sinapses e serem novamente mielinizados (NAVARRO, VIVÓ E VALERO-CABRÉ, 2007; ALLODI, UDINA E NAVARRO, 2012; ARTHUR-FARRAJ *et al.*, 2012).

1.5.1 Eventos no corpo celular e no axônio proximal

É conhecido que os neurônios apresentam uma capacidade de crescimento durante o desenvolvimento, a qual é reprimida após estabelecimento das sinapses. Porém, após uma lesão, esse potencial é reativado, sendo muito mais intenso no SNP, comparado ao SNC (ALLODI, UDINA E NAVARRO, 2012). Assim, após uma lesão em nervos periféricos, a interrupção axonal e a divisão em coto proximal e distal, leva a uma série de mudanças no corpo celular, as quais representam as alterações metabólicas necessárias para o sucesso do processo regenerativo (NAVARRO, VIVÓ E VALERO-CABRÉ, 2007).

Após a lesão, diversos sinais são mandados para o corpo celular, sinalizando a ocorrência de um dano e a necessidade de uma rápida mudança para um estado

de crescimento. Um sinal de “perigo” crucial enviado ao corpo celular decorre da elevação de íons de Ca^{+2} e ativação de calpaínas (já descrito no tópico 1.5.1). No coto proximal, o gradiente de íons de Ca^{+2} é capaz de atuar na formação de cones de crescimento e alongamento, pois sua elevada concentração é capaz de ativar a AC e elevar os níveis de cAMP e como consequência ativando seu efetor PKA que apresenta papel importante no processo regenerativo (DORON-MANDEL, FAINZILBER E TERENCEIO, 2015; SMITH *et al.*, 2020). Além disso, com o aumento nos níveis de Ca^{+2} , a calmodulina (uma proteína sensível ao Ca^{+2}) libera a GAP-43, estimulando a polimerização e estabilização da actina, auxiliando dessa forma no crescimento axonal (LISEK *et al.*, 2024). Além disso, o cAMP regula as respostas axonais às pistas enviadas para o neurônio, permitindo o crescimento e sobrevivência do axônio em crescimento (ALLODI, UDINA E NAVARRO, 2012; DORON-MANDEL, FAINZILBER E TERENCEIO, 2015). No corpo celular estas sinalizações de “perigo” induzem uma resposta, anteriormente compreendida como um evento degenerativo (dada as suas características), porém com o avanço dos estudos foi definida como um importante processo regenerativo, pois representa a tentativa do neurônio de reconstruir o axônio lesionado (MARTINEZ, CORREA E ALLODI, 2014). Este evento, anteriormente definido como cromatólise, é caracterizado pelo aumento do corpo celular, com o deslocamento do seu núcleo para regiões mais periféricas, fragmentação do retículo endoplasmático granular em ribossomos livres, redução na expressão de neurotransmissores e perda ou retração dos terminais sinápticos (ALLODI, UDINA E NAVARRO, 2012; MARTINEZ, CORREA E ALLODI, 2014). Estas respostas no corpo celular induzidas por essas sinalizações, induzem a ativação de diversas vias de sinalização (ALLODI, UDINA E NAVARRO 2012), o que leva ao aumento na expressão das RAGs (do inglês *regeneration associated genes*), acarretando na regulação para cima de proteínas de alongamento e estabilidade do cone de crescimento, como GAP 43 e SGC10, proteínas de citoesqueleto como actina e β -tubulina, expressão de fatores tróficos como NGF, BDNF, NT3/4 e seus receptores, importantes para guiar o crescimento axonal e perpetuar a regeneração, permitindo que o cone de crescimento regenere ao longo do coto distal e reinerve seu órgão alvo (Figura 13) (ALLODI, UDINA E NAVARRO, 2012; GORDON, 2016).

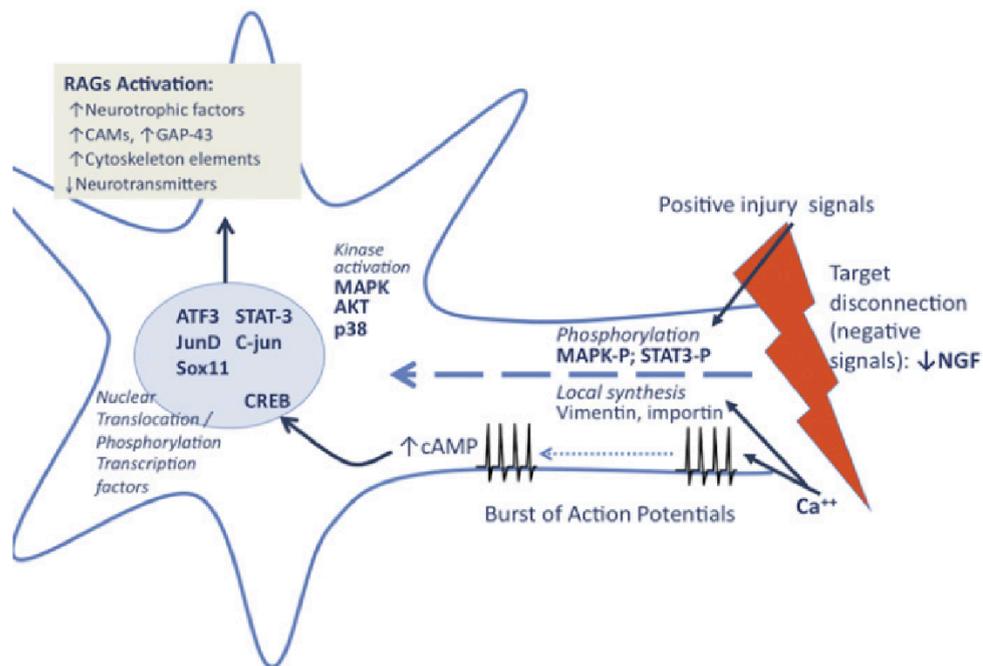


Figura 13: Sinais transmitidos para o corpo celular. Esquema representando os sinais de “perigo” enviados ao corpo celular responsáveis por ativar a maquinaria regenerativa e dar início ao processo regenerativo. Retirado de ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012.

1.5.2 Regeneração através do axônio distal

Após a conclusão do processo degenerativo, para que estes axônios regenerem ao longo do coto distal, é importante que o microambiente esteja livre de debris de mielina, moléculas inibitórias à regeneração (ALLODI, UDINA E NAVARRO, 2012). Além disso, o restabelecimento da bioenergética axonal, através da atuação das mitocôndrias, é crucial para sustentar o processo regenerativo. Dessa forma, a biogênese de mitocôndrias, além do controle de qualidade após a lesão, é necessário para sustentar as demandas do neurônio/axônio (CHENG, HUANG E SHENG, 2022). Além disso, destaca-se a importância das CS na transferência de ferro para as mitocôndrias axonais, através das ISL. O ferro é um cofator fundamental para o processo de respiração celular nas mitocôndrias, garantindo os níveis de ATP. Além disso, o ferro também é um cofator para enzimas responsáveis pela síntese de lipídios e colesterol, sendo fundamental nas CS para o processo de mielinização (MIETTO *et al.*, 2021).

Ao atingir o coto distal livre de fatores inibitórios, o axônio encontra um alinhamento das CS de reparo em sua própria lâmina basal, tanto mielínicas quanto

de Remak, formando uma espécie de coluna celular que funciona como um “túnel”. Este alinhamento apresenta papel indispensável no processo regenerativo, pois é ao longo das bandas de Büngner que os axônios em regeneração encontram as pistas moleculares necessárias para guiá-los até o alvo (JESSEN E MIRSKY, 2016; GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2017; BOSCH-QUERALT, FLEDRICH E STASSART, 2023). Os cones de crescimento são guiados até seu alvo através dos mecanismos de lamelopodia e filopodia. Estes mecanismos são representados principalmente pela regulação coordenada de actina e miosina - proteínas dinâmicas do citoesqueleto, adesão a substratos como as lâminas basais das CS, moléculas de adesão e seus receptores, moléculas de matriz extracelular, além de fatores tróficos como NGF, BDNF, NT3/4, GDNF (MORTIMER *et al.*, 2008; ALLODI, UDINA E NAVARRO, 2012).

Por fim, após o sucesso da regeneração axonal e o estabelecimento de novas sinapses, as CS estabelecem o contato com o axônio, encerrando assim a expressão de fatores associados ao reparo e retomam seu fenótipo mielinizante, reestabelecendo os mecanismos envolvidos no processo de remielinização (BOSCH-QUERALT, FLEDRICH E STASSART, 2023). Porém é digno de nota que nesse processo de remielinização a formação da bainha de mielina ocorre com uma certa diferença. Após a remielinização, é possível observar uma redução na espessura da bainha de mielina, um internodo com menor comprimento, e uma redução da distância entre os nodos de Ranvier, comparada à mielina formada durante o desenvolvimento (SCHRÖDER, 1972; SMITH *et al.*, 1982). As CS de Remak reestabelecem também a sua conexão com os axônios que não receberam mielina, formando novos feixes de Remak (BOSCH-QUERALT, FLEDRICH E STASSART, 2023)

1.6 Estratégias de reparo após lesão por transecção

A lesão por transecção (**neurotmesa – grau V**) (DEUMENS *et al.*, 2010), acarreta em uma desconexão total entre o axônio distal e o corpo celular, demandando uma abordagem microcirúrgica que reconecte e crie uma ponte entre o coto distal e proximal, e que ofereça guias para que o axônio em regeneração possa seguir o processo regenerativo, encontrar seu alvo e criar sinapses (SINGH *et al.*, 2022). São conhecidas 4 técnicas cirúrgicas para reparo do nervo periférico após

transecção, sendo elas: 1) Neurorrafia; 2) Autoenxerto; 3) Aloenxerto; 4) Tubulização (Figura 14).

A neurorrafia é um tipo de reparo onde se aproxima o coto distal e proximal para conectá-los através de sutura término-terminal, sem que seja gerado um estiramento excessivo no nervo (PESTANA *et al.*, 2018). Uma questão estrutural do nervo deve ser levada em conta nesse tipo de reparo. Após a transecção, o nervo perde a tração que é gerada pelos componentes dos seus tecidos conjuntivos e do citoesqueleto axonal, tendo como consequência uma retração inevitável após a lesão. Portanto, para optar por esse método de reparo, deve-se levar em conta a distância gerada entre os cotos proximal e distal. Existem 3 formas de categorizar essas distâncias: 1) Menor que 1 cm; 2) Até 5 cm; 3) Maior que 5 cm (SINGH *et al.*, 2022). Em distâncias menores que 1 cm, a coaptação sem gerar tensão excessiva no nervo é possível e apresenta bons resultados. Já nos intervalos até e maiores que 5 cm, esta técnica não é recomendada, visto que há necessidade de tracionar os cotos para coaptá-los. Reparos realizados sob tensão, resultam em isquemia, dor neuropática, além da formação de neuromas, o que torna a regeneração axonal inviável (Figura 14) (RICCIO *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2022).

Para tal, torna-se necessário optar pelo reparo através do autoenxerto, aloenxerto ou tubulização (CAO, LIU E CHEW, 2009). O autoenxerto, técnica de reparo considerada como padrão ouro nos tratamentos clínicos, consiste na retirada de uma parte de um nervo, comumente o nervo sural a fim de conectá-lo ao coto proximal e distal e possibilitar a regeneração axonal. Devido à exigência da retirada de uma porção do nervo sural (nervo composto em sua maior parte por fibras sensitivas), a sensibilidade desta área se torna disfuncional. Além disso, não se descarta a possibilidade de formação de neuromas, o que dificulta o transplante, não permitindo recuperação da funcionalidade (DALAMAGKAS, TSINTOU E SEIFALIAN, 2016). Já o aloenxerto tem a mesma finalidade do autoenxerto, porém este nervo é proveniente de um doador. Uma grande vantagem é a variedade e exato tipo de enxerto necessário. Entretanto, esta técnica tem como importante limitação a grande chance de rejeição além da possibilidade de transferências de doenças do doador para o receptor. Portanto, torna-se obrigatório a realização de tratamento com imunossupressores, mesmo que por curto período, aumentando o risco de infecções e formação de tumores (Figura 14) (CAO, LIU E CHEW, 2009; DALAMAGKAS, TSINTOU E SEIFALIAN, 2016; VIJAYAVENKATARAMAN, 2020).

Por fim, o uso de próteses tubulares como guias para regeneração, comumente conhecido como tubulização, vem ganhando cada vez mais atenção como uma alternativa para prevenir as desvantagens supracitadas dos reparos com autoenxerto e aloenxerto. Os tubos funcionam como um guia mecânico e bioquímico para que os axônios em crescimento do coto proximal atinjam o coto distal. Além disso reduz a formação de tecido cicatricial no local da lesão, pois impede a infiltração de fibroblastos (KITAHARA *et al.*, 1999; CHIONO E TONDA-TURO, 2015; VIJAYAVENKATARAMAN, 2020). Dentre as possibilidades de materiais, os formados por polímeros biodegradáveis são os que apresentam melhores resultados, tanto na regeneração axonal, quanto na prevenção da formação de tecido cicatricial, compressões e formação de neuromas (HOUSHYAR, BHATTACHARYYA E SHANKS, 2019). Para que as vantagens dos tubos sejam contempladas para a regeneração deve-se optar por materiais que sejam atóxicos, minimamente imunogênicos e biodegradáveis, prevenindo assim novas abordagens para retirada do enxerto e possíveis inflamações. Além disso, os tubos devem ser biocompatíveis e se assemelhar a um enxerto autólogo, sua arquitetura deve apresentar suporte estrutural e mecânico capaz de alinhar longitudinalmente e oferecer suporte ao crescimento dos axônios em regeneração. Outra característica importante que define o sucesso da terapêutica é apresentar porosidade/permeabilidade ideal para suporte trófico, flexibilidade para não comprimir/estirar o nervo. A respeito do tempo de degradação, deve ser suficiente para que o tubo resista à compressão extrínseca até que a regeneração se conclua, prevenindo assim o colapso. Por fim, deve garantir que não haja reações à corpo estranho, desencadeando respostas inflamatórias indesejadas (CHIONO E TONDA-TURO, 2015; HOUSHYAR, BHATTACHARYYA E SHANKS, 2019; VIJAYAVENKATARAMAN, 2020). Contudo, mesmo considerando as marcantes vantagens do modelo de reparo utilizando a tubulização, ainda assim a total recuperação não é atingida.

Neste trabalho, utilizamos uma lesão a qual gerou uma lacuna de 3 mm entre os cotos (comparável ao modelo de até 5 cm na clínica humana). Para definir qual estratégia de reparo utiliza, levamos em consideração alguns pontos para optar pela abordagem com a utilização de próteses tubulares. O primeiro ponto, deve-se pelas vantagens desta abordagem sobre as que utilizam o autoenxerto e aloenxerto. Segundo, nosso grupo apresenta experiência na utilização de próteses tubulares biodegradáveis para reparo, e apresenta resultados favoráveis na regeneração e

recuperação de função, utilizando tubos de colágeno + células mesenquimais (LOPES *et al.*, 2006), policaprolactona (PCL) + células mesenquimais (FRATTINI *et al.*, 2012), PCL + CS + exercícios aeróbicos (GOULART *et al.*, 2014) e poli ácido lático (PLA) + células adiposas humanas (DURÇO *et al.*, 2020). Terceiro, nosso grupo apresenta um comparativo entre os tubos de PCL e PLA (GOULART *et al.*, 2016) e de uma combinação entre PCL + PLA (PCL/PLA), polivinilpirrolidona (PVP) + PLA (PVP/PLA) e PLA sozinho (PESTANA, *et al.*, 2018), e em ambos, os resultados observados com o uso do tubo de PLA como reparo, foram superiores aos demais. Isso é devido sobretudo às características do tubo de PLA (para mais detalhes, consultar DOMINGUES, PEREIRA E BORGES, 2017). Dessa forma, considerando os tres pontos apresentados, optamos por escolher o modelo de reparo, utilizando o tubo de PLA (Figura 14).

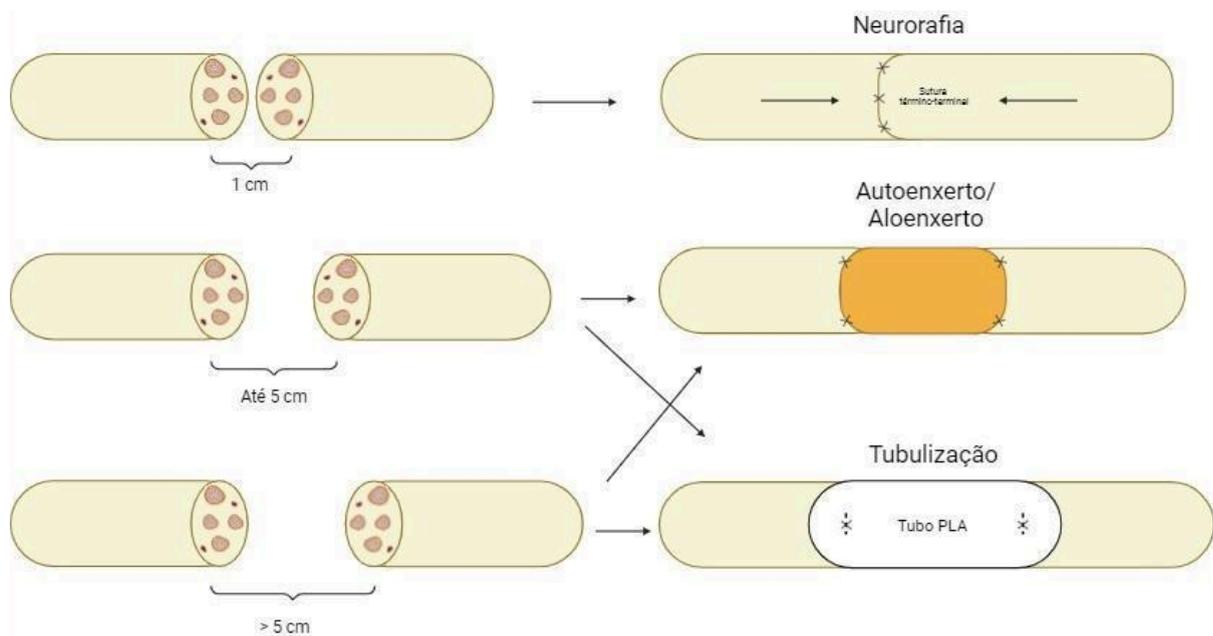


Figura 14: Tipos de reparo de nervo após neurotmesa – grau V. Representação esquemática das distâncias entre os gaps e os seus tipos de reparo possíveis. Em modelos de até 1cm, é possível realizar a sutura término-terminal. Em modelos de lesões de até 5 cm ou maiores de 5cm, necessitam de um reparo autólogo (autoenxerto ou aloenxerto) ou então com conduítes (tubulização), sendo os biodegradáveis, os de melhor escolha. Figura de autoria própria.

1.7 Terapias moleculares – o uso da inosina

1.7.1 Inosina: formação e mecanismos de ação

Embora o SNP apresente capacidade de regeneração, diversos tratamentos vêm surgindo nos últimos anos, com o objetivo de potencializar esse processo. No campo de tratamento de lesões traumáticas do SN, o uso de terapias moleculares vem ganhando grande importância. Entre estes, a inosina desperta grande interesse, dado seus importantes resultados na promoção de regeneração, neuroproteção entre outros, em lesões do SNC e SNP (KIM *et al.*, 2013; KURICOVA *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2019; CARDOSO, MARTINEZ E ALMEIDA, 2021). A inosina, um nucleosídeo de purina endógeno, é produto da rápida deaminação da adenosina (meia vida de aproximadamente 10 s), através da ação da enzima adenosina deaminase. É formada tanto no meio intracelular quanto no extracelular em condições normais de metabolismo, e apresenta uma meia vida de 15 horas. Sua concentração nos meios intra e extracelular é regulada pelos transportadores de nucleosídeos uni e bidirecionais (RIBEIRO *et al.*, 2016; WELIHINDA *et al.*, 2016). Em condições de homeostase, a concentração de inosina em relação à de adenosina pode ser de 2 a 7x maior. Porém, após estresse, sua concentração pode aumentar em até 10x comparada com a de adenosina (WELIHINDA *et al.*, 2016). Dessa forma, esta elevação nos níveis séricos de inosina, sugere que em condições de estresse, esta desempenhe papéis para restabelecimento da homeostase.

A inosina deflagra seus mecanismos de ação através da ligação a receptores acoplados à proteína G, conhecidos como receptores de adenosina ou P1R, sendo eles A1, A2A, A2B e A3, sendo encontrados em diversas células ao longo do corpo. Os receptores A1 e A3 estão ligados às proteínas G_i inibidoras da adenilil ciclase (AC), resultando na diminuição nos níveis de cAMP. Já os receptores A2A e A2B são receptores ligados à proteína G_{α_s} estimuladoras da AC, resultando no aumento nos níveis de cAMP (BURNSTOCK, 2006; WELIHINDA *et al.*, 2016; BOREA *et al.*, 2018). No SNC é possível encontrar os 4 subtipos distribuídos entre os seus respectivos tecidos e células (SEBASTIÃO E RIBEIRO, 2009). Entretanto, no SNP é possível encontrar os receptores A2A e A2B nas CS (FIELDS, 2006).

Entre os 4 receptores, o que recebe o maior destaque é o receptor A2A. Após a ligação da inosina a este receptor, ocorre um estímulo e ativação da AC através da unidade G_{α_s} , ativando dessa forma a atividade catalítica da AC. Quando ativa, a AC detecta a concentração de ATP e converte este em cAMP (ASLAM E LADILOV,

2022; OSTROM *et al.*, 2022). O aumento nos níveis de cAMP, levam a uma série de sinalizações, que resultam na sua ligação a PKA, um de seus efetores (ASLAM E LADILOV, 2022) (Figura 15).

Após a ligação da inosina ao receptor A2A, este controla a expressão e liberação de BDNF, além de promover a ação do NGF, o qual através da ligação ao receptor tirosina kinase B (TrKB) e tirosina kinase A (TrKA). Além disso, o receptor A2A ao ser ativado, é capaz de transativar os receptores TrKB sem a necessidade da ligação do BDNF. Estas ações do receptor A2A sobre os fatores neurotróficos e seus receptores, promover o crescimento axonal (DIÓGENES, RIBEIRO E SEBASTIÃO, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016). Outra resposta observada que diz respeito aos fatores tróficos é ativação da mst3b, uma quinase específica de neurônios. Sabendo que a inosina, através do receptor A2A, é responsável pela elevação dos níveis de cAMP e consequente ativação da PKA, a maior parte das funções mst3b é desencadeada através de sua fosforilação pela PKA (IRWIN *et al.*, 2006; LORBER *et al.*, 2009; QIU *et al.*, 2023). Após sua fosforilação a mst3b interage com a Ras, fosforilando a Raf. Em sequência, esta fosforila a MEK, acarretando na ativação da p42/p44 MAPK, o que é fundamental para o alongamento axonal e consequente regeneração axonal (ZHANG *et al.*, 2015). Além disso, a mst3b ativa a via da LIMK1/cofilin, através da fosforilação da LIMK1, com consequente ativação da cofilina através de sua fosforilação. Esta via ao ser ativada, atua na polimerização da F-actina, um dos componentes do citoesqueleto presente nos cones de crescimento, sendo capaz de estimular o crescimento axonal (Figura 15) (ZHANG *et al.*, 2015).

Além da fosforilação da mst3b e seus efeitos na regeneração axonal, a PKA também é responsável pela ativação da CREB. A ativação da CREB também leva a um aumento nos níveis de fatores neurotróficos, dessa forma participando e estimulando o crescimento axonal e consequente regeneração (Figura 15) (ZHANG *et al.*, 2020).

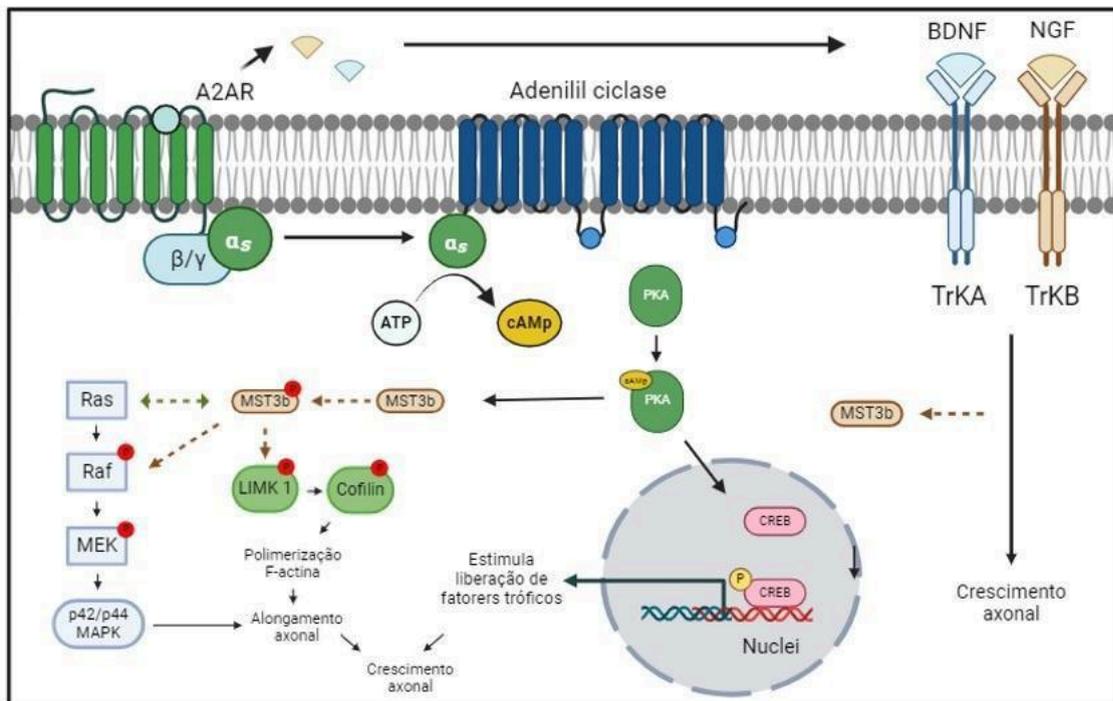


Figura 15: Mecanismos da ativação do receptor A2A. A ligação ao receptor A2A leva à ativação da adenilil ciclase, e a consequente ativação de vias ligadas a regeneração/crescimento axonal. Além disso, a ligação da inosina ao receptor A2A favorece a liberação de fatores tróficos com BDNF e NGF e ligação aos receptores TrK, acarretam no crescimento axonal. Figura de autoria própria

Outro mecanismo de ação da inosina é o seu efeito neuroprotetor, através da preservação de células gliais e neuronais durante privação de glicose e oxigênio, através do seu metabolismo intracelular (JURKOWITZ *et al.*, 1998). Através da enzima purina nucleosídeo-fosforilase, a inosina é degradada em hipoxantina, liberando nesse processo uma ribose-1-fosfato. Dessa forma, três moléculas de ribose-1-fosfato se isomerizam, formando uma molécula de ribose-5-fosfato. Esta nova ribose-5-fosfato é convertida por enzimas da cadeia das pentoses (transaldosases e transquelotases) em duas moléculas de glicose-6-fosfato e uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato. Estes intermediários fosforilados entram na via glicolítica. Dessa forma, três moléculas de ribose-1-fosfato são capazes de produzir oito moléculas de ATP. Dessa forma, o uso de inosina é vantajoso, em situações de baixa ou de depleção de ATP (Figura 16) (JURKOWITZ *et al.*, 1998). Num contexto onde a bioenergética e a interação entre as CS e os axônios é vital para a manutenção da função de ambos, e sabendo que as CS no contexto de lesão, auxiliam os axônios na tentativa de garantir sua sobrevivência (BABETTO, WONG E BEIROWSKI, 2020; BABETTO E BEIROWSKI, 2022), esta produção de ATPs além

de garantir a sobrevivência dos neurônios, pode também ser um combustível para manter a sobrevivência das CS e axônios após lesão, através da interdependência entre eles.

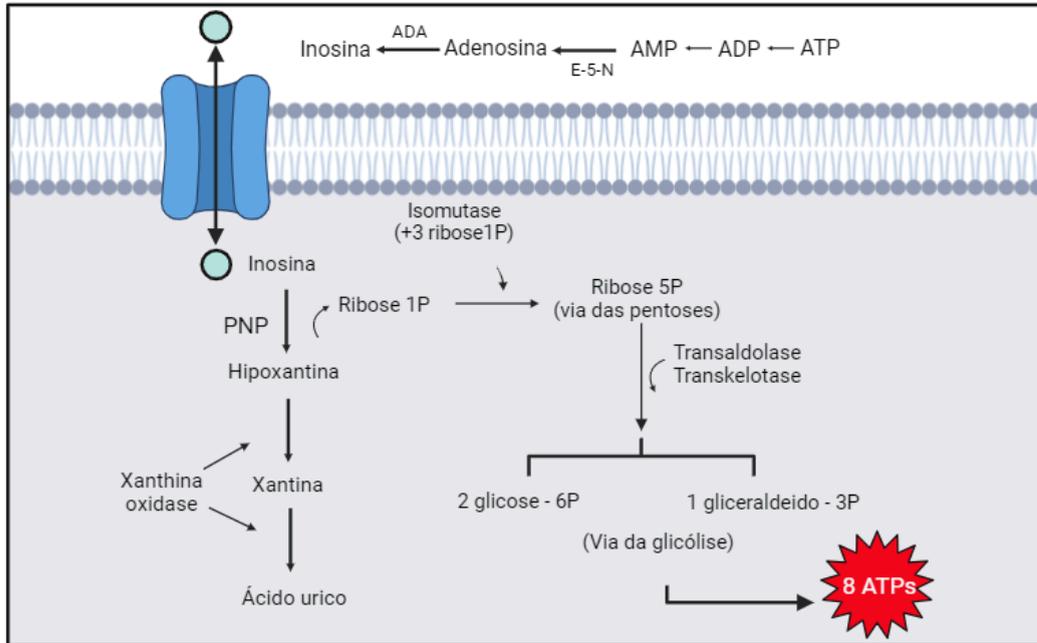


Figura 16: Cadeia de formação e degradação da inosina. Representação esquemática da formação da inosina através da cadeia de desfosforilação de ATP até a deaminação da adenosina no meio extracelular, do transporte bidirecional pelo transportador de purinas e da sua degradação até ácido úrico no meio intracelular. Além disso, está representado o mecanismo de neuroproteção. Figura de autoria própria.

1.7.2 – Uso da inosina em lesões nervosas

O uso da inosina como forma de tratamento para lesões do SNC é amplamente descrito e apresenta resultados satisfatórios. O uso da inosina após transecção unilateral do trato corticoespinal, promove um extenso brotamento de fibras do lado não axotomizado em direção ao lado lesado (BENOWITZ *et al.*, 1999). Outro trabalho utilizando hemiseção da coluna dorsal na medula espinal, porém com infusão contínua e controlada de inosina através do uso de mini-bombas, foi capaz de estimular os axônios do lado contralateral a brotarem e estabelecerem com interneurônios proprioespinhais longos, levando a melhor recuperação da função motora (KIM *et al.*, 2013). Por outro lado, a administração oral de inosina foi capaz de garantir a sobrevivência de neurônios no corno anterior da substância cinzenta e maior preservação da substância branca, promovendo a regeneração e uma maior recuperação funcional (KURICOVA *et al.*, 2014). O tratamento intraperitoneal de inosina em uma lesão compressiva de medula espinal, também foi capaz de

promover maior regeneração, redução da cicatriz glial após a lesão e sobrevivência de oligodendrócitos, promovendo também recuperação da função motora e sensitiva (CARDOSO *et al.*, 2024).

Por outro lado, o uso da inosina como tratamento para lesões traumáticas do SNP não havia sido utilizado. Dessa forma nosso grupo através do modelo de lesão por esmagamento do nervo isquiático, utilizou de forma pioneira o tratamento com inosina pela via intraperitoneal. Como esperado, a inosina promoveu a sobrevivência dos motoneurônios no corno anterior da medula espinal e dos neurônios sensitivos no gânglio da raiz dorsal, além de acelerar a regeneração. Além disso, o grupo tratado com inosina, após duas semanas apresentava uma reduzida quantidade de macrófagos no microambiente e uma pequena quantidade de ovóides de mielina, devido à antecipação do processo inflamatório. Estes resultados culminaram na melhor recuperação da função motora e sensitiva, quando comparados ao grupo controle (CARDOSO *et al.*, 2019).

Acerca dos resultados observados no supracitado trabalho de mestrado, a qual é de minha autoria, lidamos com um modelo de lesão branda (**axonotmese - grau II**), o qual apresenta recuperação espontânea, dado ao pequeno comprimento do membro inferior do camundongo e preservação do arcabouço conjuntivo do nervo. Porém, o uso da inosina num modelo de lesão grave e de recuperação não espontânea, com necessidade de reparo, ainda não foi investigado. Portanto, o objetivo desse trabalho visa responder e investigar se a combinação entre o tubo de PLA, o qual apresenta as melhores respostas na promoção da regeneração após o reparo, e a inosina, tratamento utilizado em lesão branda de nervo periférico e que apresentou antecipação da regeneração, é capaz de num modelo mais grave promover regeneração e conseqüentemente recuperação funcional.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial regenerativo de nervos isquiáticos transecionados, após reparo por tubulização e injeção intraperitoneal de inosina, em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

1) Avaliar através da microscopia óptica, o número total de fibras mielínicas e vasos sanguíneos e a morfometria dos nervos isquiáticos dos animais submetidos à transecção + reparo com tubo de poli ácido láctico (PLA) e tratados com inosina;

2) Avaliar através da microscopia eletrônica de transmissão a regeneração dos nervos isquiáticos dos animais submetidos à transecção + reparo com tubo de poli ácido láctico (PLA) e tratados com inosina;

3) Avaliar através de imuno-histoquímica para neurofilamento (NFH), a regeneração dos animais submetidos à transecção + reparo de tubo de PLA e tratados com inosina

4) Avaliar através de imuno-histoquímica, a presença de receptor A2A no microambiente e a possível localização em células de Schwann (MBP) nos animais submetidos à transecção + reparo com tubo de PLA e tratados com inosina;

5) Avaliar através do peso seco dos músculos, a perda de massa muscular nos músculos gastrocnêmios de animais submetidos à transecção + reparo com tubo de PLA e tratados com inosina;

6) Avaliar através da marcação para α -bungarotoxina a morfologia e a quantidade de junções neuromusculares (JNM) nos músculos gastrocnêmios de animais submetidos à transecção + reparo com tubo de PLA e tratados com inosina;

7) Avaliar através do Índice de Função do Isquiático (IFI), a recuperação da função motora dos animais submetidos à transecção + reparo com tubo de PLA e tratados com inosina;

8) Avaliar através do analgesímetro e do pinprick, a recuperação da função sensitiva dos animais submetidos à transecção + reparo com tubo de PLA e tratados com inosina;

9) Avaliar através da eletroneuromiografia, a regeneração axonal através da obtenção do potencial de ação muscular composto e da velocidade de condução do nervo dos animais submetidos à transecção + reparo com tubo de PLA e tratados com inosina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos realizados neste trabalho estão resumidos na figura abaixo (Figura 17) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, conforme o Protocolo CEUA n° 080/23 estando todos os procedimentos realizados na pesquisa de acordo com as recomendações do comitê de ética.

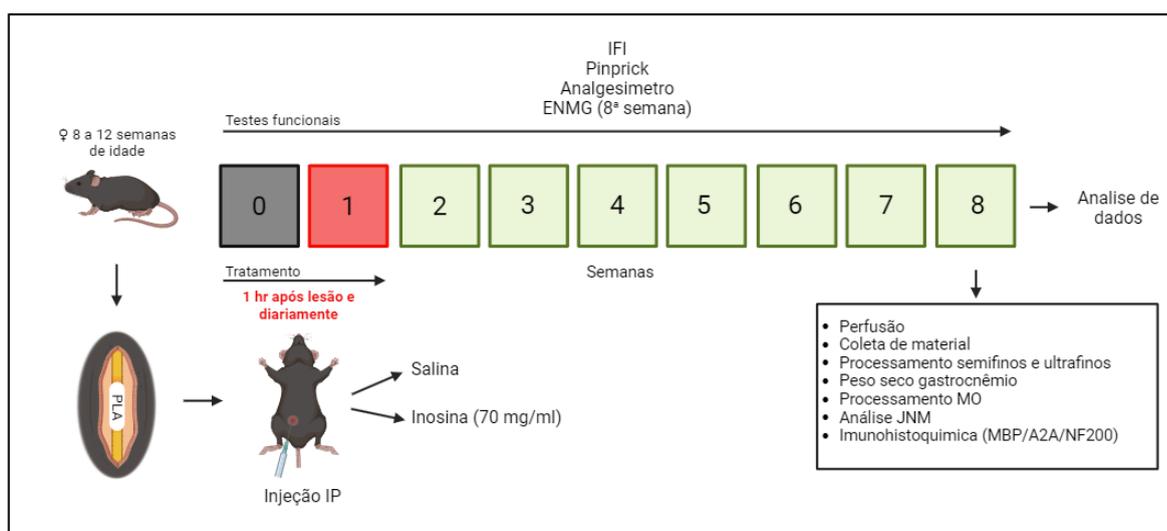


Figura 17: Desenho experimental da tese. Esquema do desenho experimental, dividido em 8 semanas. O momento 0 corresponde ao dia da lesão. Os momentos de 1 a 8 semanas, correspondem à sobrevivência dos animais. Note que o tratamento é aplicado pela via intraperitoneal (IP) 1 hora após a lesão e diariamente até o 7º dia (exatamente 1 semana após a lesão). Na 8ª semana, serão realizados os procedimentos listados na figura.

3.1 Procedimento cirúrgico + reparo do nervo:

Camundongos fêmeas jovens adultas da linhagem C57/BL6 com 8-12 semanas de idade foram pesados e anestesiados com Ketamina (100 mg/kg) e Xilazina (15mg/kg) por via intraperitoneal. Após anestesia foi realizada a tricotomia do membro direito e o nervo isquiático foi exposto através de uma incisão longitudinal na face posterior do terço proximal da coxa utilizando uma lâmina de bisturi n°10, sem secção muscular. Após exposição, o nervo isquiático foi seccionado com uma microtesoura oftálmica. Após a transecção os segmentos proximal e distal do nervo foram inseridos nas respectivas extremidades de um tubo de poli ácido láctico (PLA), e foram suturados com fio 10.0. O comprimento total da prótese foi de 5 mm, de forma a deixar um intervalo de 3 mm entre os segmentos do

nervo para a regeneração e 1 mm distal e proximal, onde foram realizadas as suturas (Figura 18). Após a finalização da tubulização, a pele foi suturada e o animal foi deixado em repouso na gaiola para se recuperar. Todos os procedimentos foram realizados com o auxílio de uma lupa.

3.2 Preparo e administração dos tratamentos:

Para o preparo da solução salina 0,9% utilizamos 0,9g de Cloreto de Sódio (Sigma Aldrich®) em 100 ml de água destilada e para o preparo da Inosina utilizamos 2,8 g de Inosina (Sigma Aldrich®) + 40 mg de Bicarbonato de sódio em 40 ml de água destilada. A solubilidade da inosina aumenta em pH elevado, garantindo assim a sua máxima solubilização (Kim et al., 2013). Dessa maneira, o pH tanto da solução salina quanto o da inosina foi ajustado para 9,4, utilizando Hidróxido de Sódio 2M (Sigma Aldrich®).

Os animais foram divididos randomicamente em dois grupos de acordo com o tratamento recebido: 1) PLA + salina; 2) PLA + inosina. A administração dos tratamentos foi realizada em uma dose de 70 mg/kg (KIM *et al.*, 2013) e se seguiu durante sete dias, até antes da realização do primeiro teste funcional. Foi dada uma sobrevida de oito semanas e, durante esse período, realizaram-se os testes funcionais para avaliar a recuperação motora e sensitiva.

3.3 Perfusão e obtenção dos tecidos:

Após oito semanas de sobrevida, os animais foram anestesiados e perfundidos por via intracardíaca com solução fixadora contendo paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Os animais foram dissecados, e o nervo foi dividido em três segmentos para análise, correspondentes às partes proximal (segmento A), média (segmento B) e distal (segmento C) do tubo, conforme ilustrado na figura 18. Em seguida os segmentos foram deixados em solução fixadora correspondente à análise que será feita posteriormente. O músculo gastrocnêmio também foi retirado para posterior análise morfológica das junções neuromusculares.

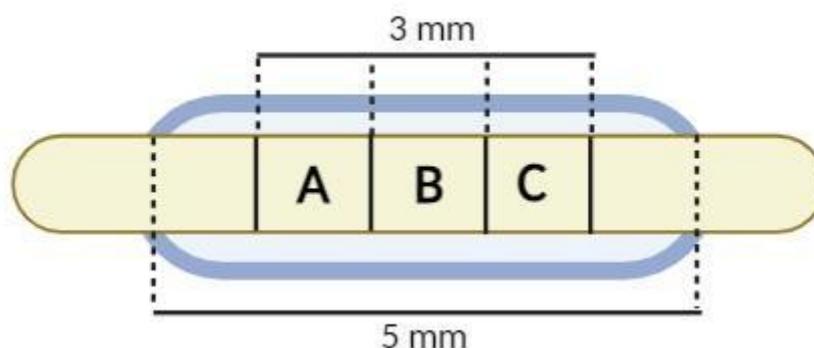


Figura 18: Esquema ilustrativo da tubulização e dos três segmentos do nervo. A. Segmento proximal do nervo; B. Segmento médio do nervo regenerado, processado para microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de transmissão (MET); C. Segmento distal à lesão, processado para as análises imuno-histoquímicas (IHQ).

3.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET):

Após a fixação por perfusão e a pós-fixação em Tampão Cacodilato 0,1M + Glutaraldeído 2,5%, foram separados para processamento para ME os seguintes materiais: segmentos B de nervos isquiáticos direito e esquerdo. Os materiais foram lavados em tampão CaCO 0,1M três vezes e pós fixados em uma mistura de tetróxido de ósmio 1% em tampão CaCO 0,1M, Ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio a 50 nM por aproximadamente 2 horas. As amostras foram lavadas em tampão CaCO 0,1M e colocadas em solução aquosa de acetato de uranila a 1%. As amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato a 0,1M (pH 7,4), e desidratados em uma bateria gradual de acetonas (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%), incorporadas em uma resina, e deixadas em uma estufa a 60°C para polimerização por 48 horas.

Os blocos confeccionados foram devidamente aparados e, posteriormente, foram obtidos cortes semifinos com espessura de 500 nanômetros, em ultramicrótomo RMC MT-6000, corados com azul de toluidina a 1% em água. Os cortes semifinos foram fotografados em microscópio óptico convencional (Zeiss Axioskop 2 plus). Os cortes ultrafinos foram obtidos no mesmo micrótomo, com espessura entre 60 e 70 nanômetros, coletados em grades de cobre com 300 quadrículas e analisados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão, modelo Zeiss EVO MA10.

3.5 Análise morfométrica:

Para a quantificação do número total de fibras mielínicas e o número de vasos sanguíneos, no segmento B do nervo isquiático, foram obtidas imagens de cortes semifinos, com aumento de 630 vezes, através do programa Axiovision Rel. 4.5. As imagens obtidas foram submetidas à análise, utilizando o software Image J (1.42q). Através do plugin cell counter, foi quantificado manualmente o número total de fibras mielínicas regeneradas e o número de vasos sanguíneos. Os valores obtidos foram comparados entre os grupos.

Para a análise quantitativa da área da mielina, área do axônio, área da fibra nervosa e razão-g, os mesmos cortes transversais semifinos foram fotografados em 5 campos diferentes (Figura 19) com aumento de 1000 vezes, usando o programa Axiovision Rel. 4.5. A partir das imagens obtidas, utilizamos o Image J para quantificação dos parâmetros descritos e os testes estatísticos específicos para analisar cada condição.

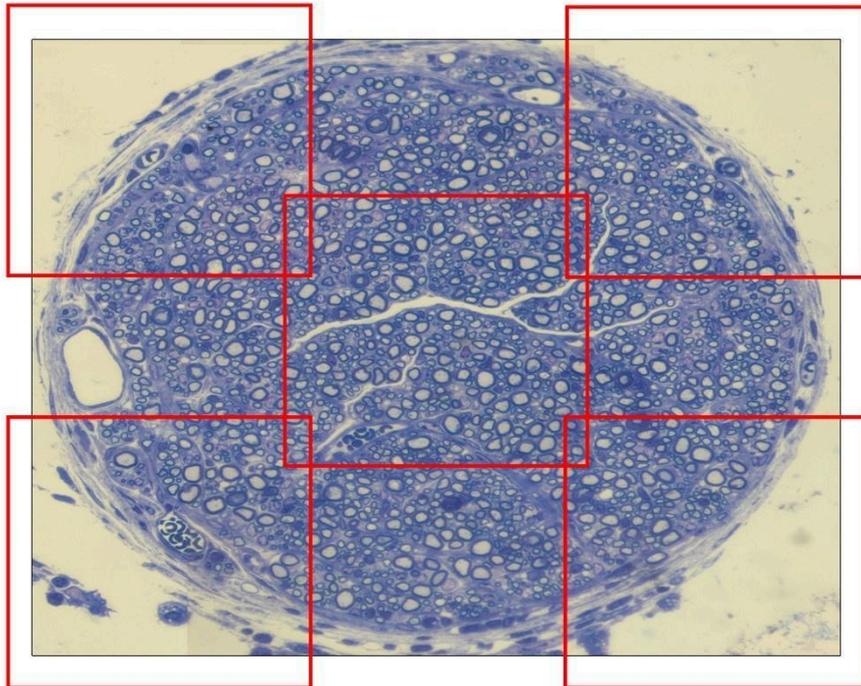


Figura 19: Imagem representativa de um nervo regenerado e dos 5 campos fotografados. Representação de um corte transversal semi fino, da porção tibial distal à lesão, e o esquema das áreas ilustrando os 5 campos fotografados em maior aumento.

A razão-g é um parâmetro amplamente utilizado para mensurar o grau de mielinização da fibra nervosa, e está relacionada com a velocidade de condução do impulso nervoso. É obtida através da razão entre diâmetro do axônio - d e o

diâmetro da fibra nervosa – D (d/D) (Figura 20). O índice de razão-g mais adequado para o nervo isquiático encontra-se na faixa de 0,55-0,68 (CHOMIAK E HU, 2009).

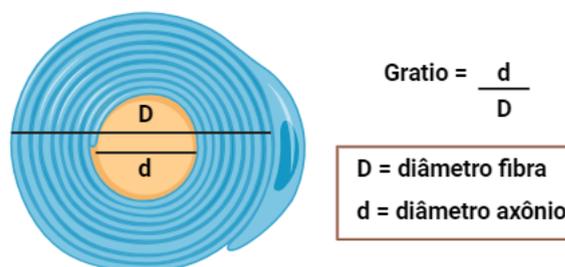


Figura 20: Representação esquemática da razão-g. É obtida através da divisão do diâmetro do axônio (d) pelo diâmetro da fibra nervosa (D)

3.6 Microscopia Óptica (MO):

Após a dissecação e a pós-fixação como citados anteriormente, foram separados para cortes congelados os seguintes materiais: segmento C do nervo isquiático direito e esquerdo e músculos gastrocnêmios direito e esquerdo. Os materiais foram lavados em tampão Fosfato 0,1 M três vezes e crioprotetidos em sacarose 10%, 20% e 30% em tampão cacodilato a 0,1M. Após o final da crioproteção, os materiais foram congelados em OCT (TissueTek®). Após congelamento, cortes transversais de 10µm de espessura dos nervos Isquiáticos e cortes longitudinais de 60 µm de espessura dos músculos gastrocnêmios foram obtidas utilizando em um Criostato (Leica CM 1850) coletados em lâminas gelatinizadas para futuros experimentos.

3.7 Imuno-histoquímica de fluorescência (IHQ)

Para visualizar a presença dos neurofilamentos e dos receptores A2A nas CS, realizamos imuno-histoquímica para NFH, A2AR e MBP respectivamente. Para tal, utilizamos as lâminas contendo os cortes do segmento C do nervo (conforme descrito no item 3.6 para MO). As lâminas foram inicialmente colocadas na estufa à 37°C por cinco minutos e submetidas ao permanganato de potássio 0,06% por 10 minutos. As lâminas foram lavadas uma vez por cinco minutos em solução tampão fosfato salina (PBS) pH 8,0 e para bloqueio de sítios inespecíficos utilizamos soro normal de cabra a 10% e albumina de soro bovino (BSA) a 5% em PBS contendo triton (PBS-triton) a 0,3% por uma hora na temperatura ambiente em uma câmara

escura. Em seguida, as amostras foram lavadas uma vez por cinco minutos em PBS e após a lavagem, foram colocados os anticorpos primários (tabela 1), por toda noite na geladeira a 4°C, em câmara escura e úmida. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS três vezes por dez minutos cada, seguida de adição de anticorpo secundário (tabela 2) por uma hora e meia. Logo após as lâminas foram lavadas uma vez por dez minutos em PBS e foi colocado o marcador nuclear DAPI, em uma diluição de 1:10.000 em água destilada. Por fim, as lâminas foram lavadas em PBS três vezes por dez minutos e por fim foram montadas com laminulas com Flouromount (SIGMA-4680, USA). As imagens foram obtidas em um microscópio confocal (ZEISS CELL DISCOVERER 7), com aumentos de 200x e 400x e quantificadas usando a área imunomarcada (per area) no software Image Pro Plus (Media Cybernetics).

Anticorpo 1°	Produzido em	Diluição	Fabricante	Lote
A2AR	Coelho	1:200	Invitrogen	PA1-042
MBP	Rato	1:200	Milipore	MAB386
NFH	Camundongo	1:1000	Sigma	N4142

Tabela 1: Especificações dos anticorpos primários utilizados. Anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica de fluorescência.

Anticorpo 2°	Produzido em	Diluição	Fabricante	Lote
Alexa 488 anti rato	Cabra	1:500	Invitrogen	565186
Alexa 546 anti coelho	Cabra	1:500	Invitrogen	442417
Alexa 488 anti camundongo	Cabra	1:500	Invitrogen	56649A

Tabela 2: Especificações dos anticorpos secundários utilizados. Anticorpos secundários utilizados nas reações de imuno-histoquímica de fluorescência.

3.8 Análise do músculo gastrocnêmio

3.8.1 Peso seco

Para a análise da atrofia muscular após a lesão por transecção e tratamento com inosina + PLA, os músculos gastrocnêmios D e E foram dissecados, pós fixados em PFA 4%, secos em papel não abrasivo, de forma delicada e sem pressão e

pesados utilizando uma balança de precisão analítica. O peso seco obtido foi em gramas.

3.8.2 Análise da morfologia das junções neuromusculares (JNM)

Com o objetivo de quantificar o número de junções neuromusculares, utilizamos a α -bungarotoxina (neurotoxina que se liga a subunidade α dos receptores de acetilcolina), a fim de identificar as JNM no músculo gastrocnêmio. Os cortes foram obtidos conforme descrição no tópico 3.6. Os cortes foram levados para uma estufa a 57°C por 10 min, posteriormente foram lavados duas vezes por cinco minutos cada em PBS pH 8,0. Em seguida, para bloqueio de sítios inespecíficos, foi utilizada uma solução contendo PBS, triton-x 100 a 0,3% e soro de cabra (NGS) a 10%, por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário diluído em uma solução contendo PBS, triton-x 100 a 0,3% e soro normal de cabra (NGS) a 10% (anti- α -Bungarotoxina, diluição 1:200, Invitrogen) por um período de 2 horas. Então, os cortes foram lavados em PBS pH 8,0 por quatro vezes de cinco minutos cada. Ao final, as lâminas foram lavadas em água destilada por cinco minutos, montadas com meio de montagem aquoso fluoromount (Sigma). Foram utilizados 3 cortes/lâmina para as análises e as JNM foram contabilizadas utilizando um contador de células manual através de um microscópio de fluorescência (ZEISS, AXIOSKOP 2 PLUS). Já as imagens finais foram obtidas através do uso do microscópio confocal (ZEISS CELL DISCOVERER 7) com aumentos de 400x.

3.9 Testes funcionais:

3.9.1 Índice de Função do Isquiático

Para a análise da marcha do animal antes e após a lesão, realizamos o IFI. Para isso, utilizamos um corredor que permita que os animais caminhem livremente por todo seu trajeto e deixe em um papel a marcação das suas pegadas (INSERRA, BLOCH E TERRIS, 1998).

Para a realização do teste utilizamos um corredor com 45 x 6,5 cm com um papel Canson branco (A4 140g/m²) para a marcação das patas. A impressão das patas traseiras foi obtida pintando as patas com tinta à base d'água e colocando os animais para caminhar livremente no corredor. Após marcadas, as patas escolhidas

para as medidas foram selecionadas em um ponto onde o camundongo andava em um passo moderado, sem parada (INSERRA, BLOCH E TERRIS, 1998).

Os animais foram submetidos ao IFI no período pré-operatório e semanalmente até a oitava semana após a lesão. Para análise do IFI, foram medidos os parâmetros de abertura dos dedos, que compreende a distância entre o primeiro e quintos dedos, e o comprimento da pegada, que compreende a distância entre o terceiro dedo e o coxim traseiro. Estas medidas foram obtidas tanto do lado experimental quanto do lado normal, e calculadas usando a fórmula proposta por Inserra e colegas (1998) (Figura 21).

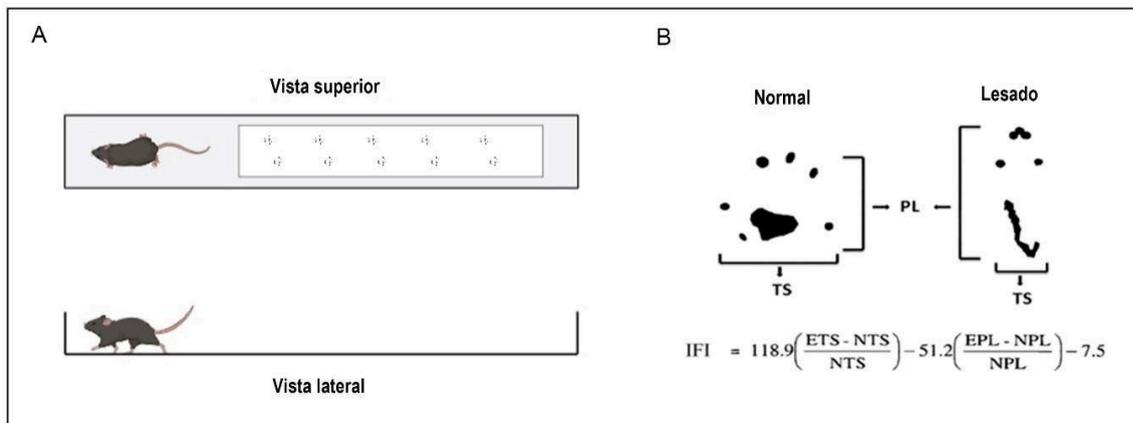


Figura 21: Esquema da execução do teste, marcação da pata e fórmula IFI. (A) Vista superior representando o posicionamento da folha no corredor com a marcação das patas e vista lateral representando o animal executando o teste (correndo) dentro do corredor. (B) Imagem ilustrativa das pegadas do animal do lado normal (sem lesão) e do lado com e lesão, além da fórmula utilizada para obtenção do IFI. (PL) comprimento da pata; (TS) espalhamento dos dedos; (ETS) valor do espalhamento dos dedos do lado lesado; (NTS) valor do espalhamento dos dedos do lado normal; (EPL) valor do comprimento da pegada do lado lesado; (NPL) valor do comprimento da pegada do lado normal.

3.9.2 Teste da picada do alfinete

Para análise da sensibilidade após a lesão, utilizamos o teste da picada do alfinete. Os animais foram colocados em uma grade elevada e a parte lateral da superfície plantar foi brevemente estimulada utilizando um alfinete seguro suficiente para recuar, mas não furar a pele (MA *et al.*, 2011). Para este teste, utilizamos o alfinete 000 de entomologia, por ser mais fino e estimular preferencialmente receptores nociceptivos. Utilizamos cinco áreas na parte lateral da superfície plantar traseira direita, na área de inervação pelo nervo isquiático, sendo elas: calcâneo, metatarso, porção medial do metatarso, metacarpo falangeana e falanges. Cada

área é estimulada e é observada uma resposta de retirada ou lambida na pata. Caso a resposta for positiva, é pontuada como 1. Caso não for observada uma dessas respostas, é pontuada como 0. A pontuação máxima a ser atingida é 5 (Figura 22).

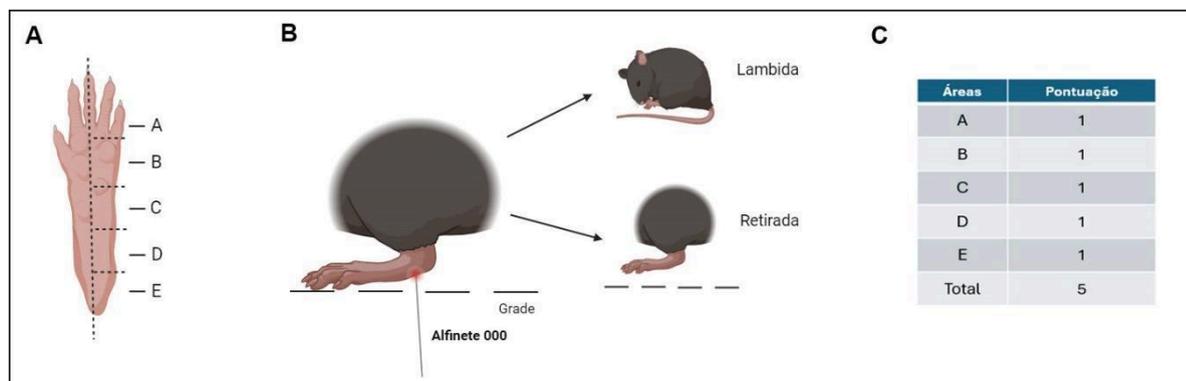


Figura 22: Esquema da área de estímulo doloroso e pontuação do teste pinprick. (A) Representação esquemática das áreas a serem estimuladas (A-E). (B) Execução do teste e respostas para considerar pontuação positiva (1). (C) Tabela representando a pontuação dada a cada área e total de pontos. Considerar 1 – estímulo positivo; 0 – estímulo negativo.

3.9.3 Analgesímetro

Para análise da sensibilidade tátil após a lesão, utilizamos o analgesímetro. Os animais foram acomodados em uma grade elevada e um transdutor de pressão com uma ponteira de 1mm na ponta do sensor, acoplado a um Von Frey eletrônico (Insight®, Ribeirão Preto, Brasil) foi utilizado para estimular a superfície plantar da pata traseira dos animais, e através da força aplicada pelo examinador, foi observada a retirada da pata. O limiar de retirada foi determinado como a média da força mais baixa que provocou a retirada após três estímulos. Os animais foram submetidos ao analgesímetro no período pré-operatório e semanalmente até a oitava semana após a lesão (Figura 23).

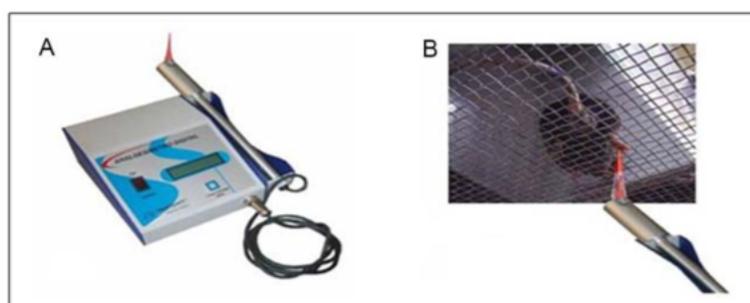


Figura 23: Aparelho Von Frey digital e esquema de realização do teste. Observe em A o analgesímetro digital para teste de sensibilidade mecânica (Von Frey). Note em B a execução do teste pela aplicação de uma força através de uma ponteira de polipropileno na extremidade do braço transdutor.

3.10 Eletroneuromiografia

Para analisar a regeneração axonal após lesão por transecção do nervo isquiático realizamos a eletroneuromiografia oito semanas após a lesão. Os animais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/kg) e Xilazina (15mg/kg) por via intraperitoneal e o nervo isquiático foi exposto como descrito no tópico 3.1. Posicionamos três eletrodos, conectados a um PowerLab 4/35® e a um Bioamp® (AdInstruments® - PowerLab 4/35), sendo um de aterramento na pele do animal e dois de captação um no músculo gastrocnêmio e um no tendão do gastrocnêmio. O programa foi configurado para liberar um estímulo de 10V. O nervo foi estimulado brevemente em dois pontos distantes 5 mm (comprimento total do tubo) utilizando um eletrodo de estimulação (AdInstruments®) (Figura 24). O potencial de ação muscular composto do ponto proximal ao tubo, a latência entre os dois pontos e a velocidade de condução do nervo resultante da distância total (5 mm) e o delta entre as latências dos dois pontos (L1-L2), foram analisados através do Software LabChart 8® (AdInstruments).

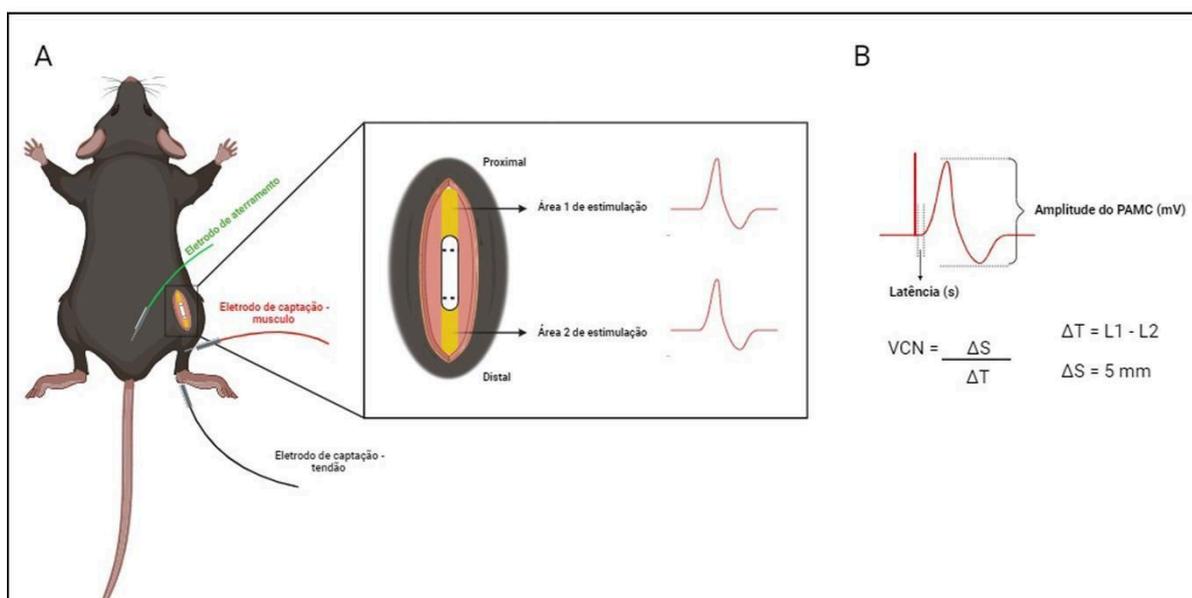


Figura 24: Esquema representativo da realização da eletroneuromiografia e parâmetros analisados. Em A representação do posicionamento dos eletrodos de captação no músculo (vermelho) e no tendão (preto), e do eletrodo de aterramento (verde), no animal. Além disso, representação das áreas de estimulação 1 (proximal) e 2 (distal), no nervo. Em B representação da curva do potencial de ação (PAMC) e dos parâmetros analisados: amplitude do PAMC, latência e velocidade de condução do nervo (VCN).

3.11 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram analisados através do GraphPad Prism 8 e foram apresentados em forma de média e \pm erro padrão da média (SEM, do inglês *standard error of the mean*). Utilizamos como teste estatístico o teste t não pareado. Para dados paramétricos utilizamos o pós teste Welch e para dados não paramétricos utilizamos o pós teste Mann-Whitney. Para dados que apresentavam 3 grupos, utilizamos o teste one way ANOVA e Tukey como pós teste para fazer a comparação entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ (95%) foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Análise histológica e morfométrica de nervos isquiáticos regenerados após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina

Após oito semanas de sobrevida, o segmento B dos tubos de PLA foram processados e realizados cortes semifinos transversais corados com azul de toluidina. Dessa maneira, na figura 25 podemos observar cortes transversais semifinos, em um aumento de 630 vezes, do grupo salina (25, A) e inosina (25, B), respectivamente.

Ao analisar os cortes transversais, observamos que o tubo de PLA foi capaz de organizar e direcionar as fibras ao longo de seu trajeto, pois em ambos os grupos as fibras e vasos sanguíneos apresentam uma distribuição proporcional e direcionamento correto. Contudo, os nervos regenerados do grupo inosina + PLA apresentaram uma melhor organização das fibras, em comparação com o grupo salina + PLA (Figura 24, A e B). O grupo salina + PLA apresenta uma aglomeração de fibras, característico de fibras em regeneração pós reparo, diferindo do grupo inosina, que apresenta uma organização próxima ao que é encontrado no nervo normal. Além dessa diferença marcante, o grupo inosina + PLA aparenta apresentar uma maior quantidade de fibras regeneradas.

Para confirmar essa observação, realizamos a contagem do número total de fibras mielínicas e também o número de vasos sanguíneos após o reparo com tubo PLA e tratamento com inosina. A contagem do número total de fibras mielínicas neste modelo determina o grau de regeneração. O gráfico (Figura 25, C), demonstra que o grupo inosina + PLA apresenta um maior número de fibras mielínicas, quando comparado ao grupo salina + PLA ($1293 \pm 85,49 \times 817 \pm 89,2$; $**p < 0,01$). Com relação ao número de vasos sanguíneos (Figura 25, D), o grupo inosina + PLA também apresenta uma maior quantidade de vasos sanguíneos, quando comparado com o grupo salina + PLA ($30,2 \pm 2,3 \times 17,20 \pm 2,7$; $**p < 0,01$). Este resultado demonstra que associar a inosina ao reparo com tubo PLA foi capaz de estimular o potencial regenerativo dos neurônios, promovendo uma robusta regeneração, além de estimular a angiogênese.

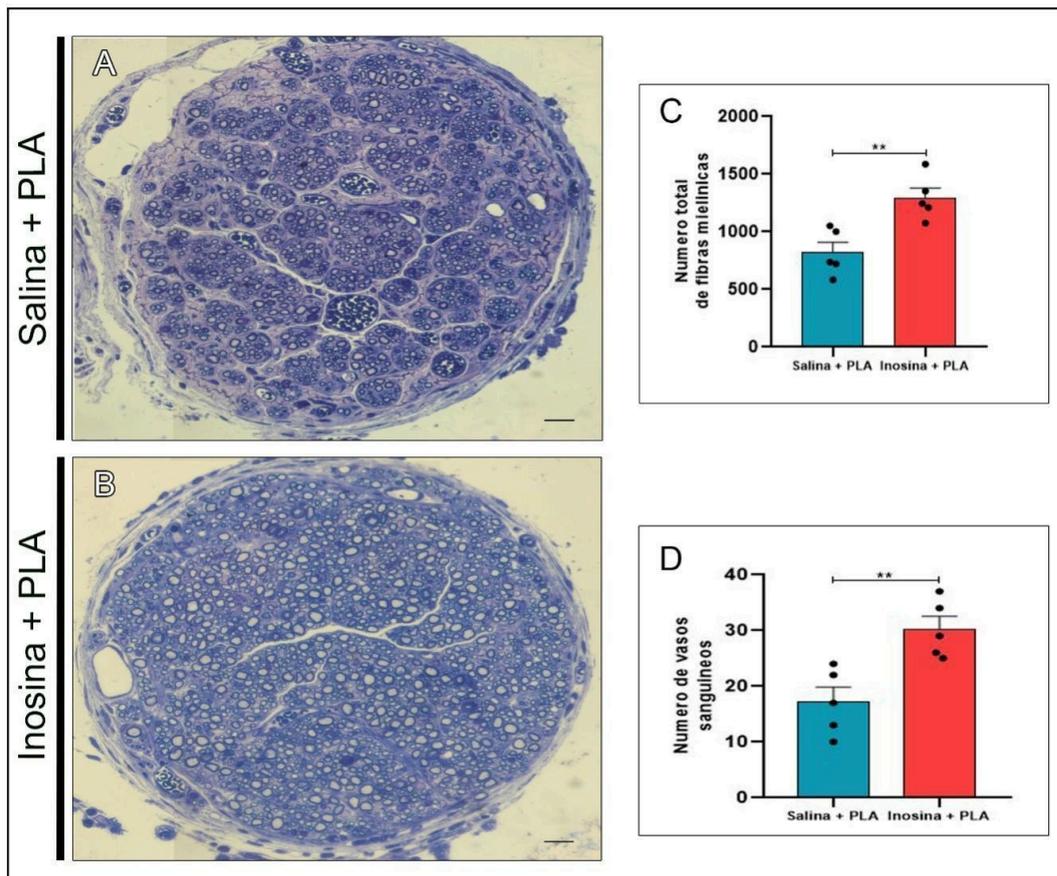


Figura 25: Análise quantitativa do número total de fibras mielínicas e de vasos sanguíneos. A) Nervo isquiático animal salina + PLA; B) nervo isquiático animal inosina + PLA; C) gráfico do número total de fibras mielínicas; D) gráfico do número de vasos sanguíneos. Grupo salina + PLA (n=5); grupo inosina + PLA (n=5). **p<0,01; Barra de escala 20 µm.

Como observado anteriormente, o grupo inosina + PLA apresenta uma melhor organização. Analisando qualitativamente os cortes semifinos com aumento de 1000 vezes (Figura 26, A e B) e cortes ultrafinos, com aumento de 6000 vezes (Figura 26, C e D), podemos observar que o grupo salina + PLA (Figura 26, A e C) apresenta uma organização heterogênea, com ilhotas contendo pequena e/ou média quantidade de fibras espaçadas (linha tracejada vermelha), com matriz extracelular bem evidente e circundadas por um tecido conjuntivo (seta branca - perineuro), ao longo de todo o nervo. Quando comparamos esse microambiente com o do grupo inosina + PLA (Figura 26 B e D), podemos observar uma organização mais homogênea, sem o padrão de agrupamento observado no grupo salina + PLA, com fibras mais próximas, menos matriz extracelular evidente e um tecido conjuntivo mais organizado (seta branca). Em ambos os grupos é possível observar núcleos de CS (asterisco azul). Além disso, no grupo inosina + PLA (Figura 26, C), os axônios aparentam apresentar diâmetros maiores do que os do grupo salina + PLA (Figura 26, A). Esta observação fica ainda mais evidente quando observamos os cortes ultrafinos (Figura 26, B e D).

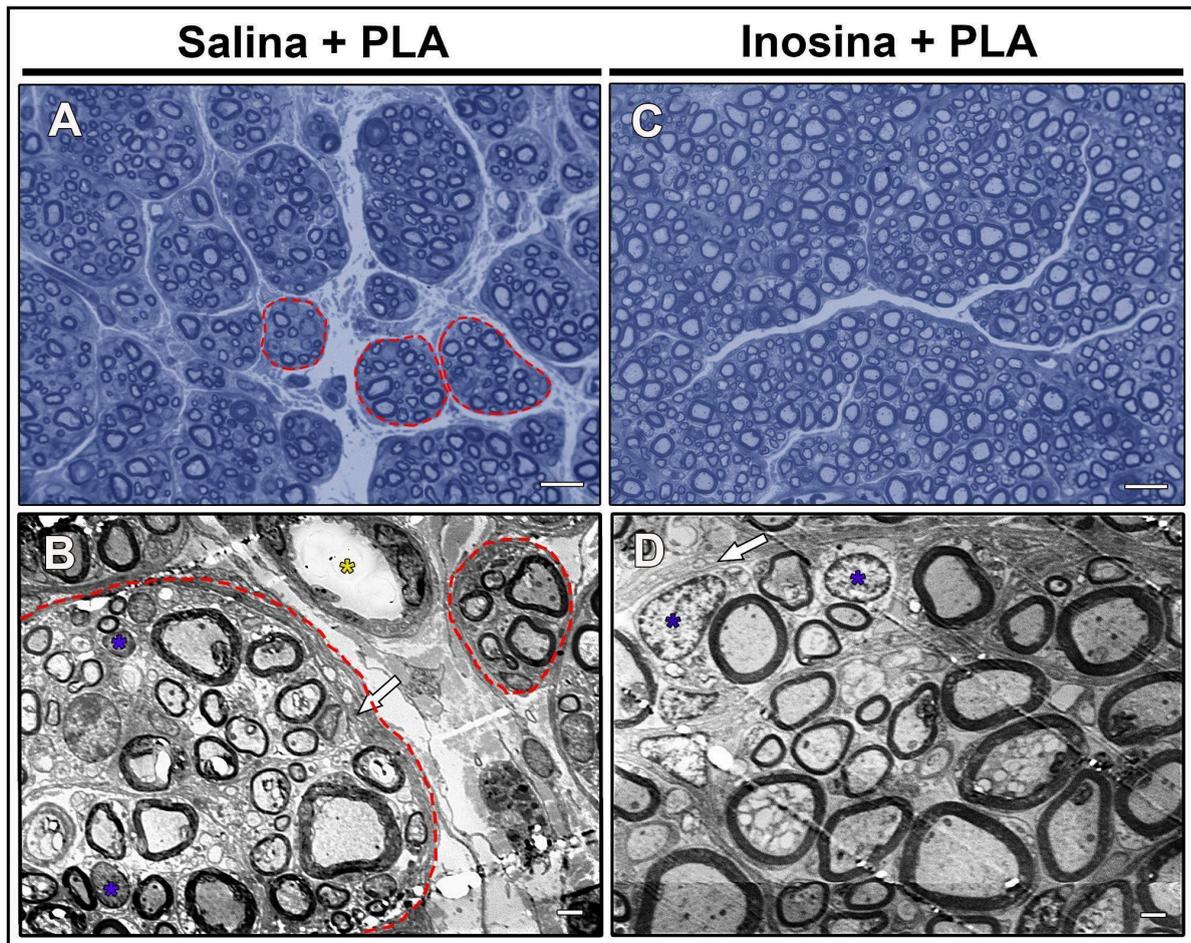


Figura 26: Morfologia e ultraestrutura de nervos em regeneração. A) Semifino animal salina + PLA; B) semifino animal inosina + PLA; C) ultrafino animal salina + PLA; D) ultrafino animal inosina + PLA. Barra de escala 10 μ m (A e C); barra de escala 2 μ m (B e D). Setas brancas: perineuro; setas pretas: células perineurais; linha tracejada vermelha: ilhotas regenerativas; asterisco azul: CS; asterisco amarelo: vaso sanguíneo.

Com relação às análises morfométricas, podemos constatar que os axônios do grupo inosina + PLA, apresentam uma maior área quando comparados ao grupo salina + PLA, como observado na Figura 26 (A-D) e demonstrado no gráfico da área dos axônios (Figura 27, A), onde o grupo inosina + PLA apresenta uma diferença significativa quando comparado ao grupo salina + PLA ($4,62 \pm 0,3 \times 3,5 \pm 0,22$, $*p < 0,05$). No que diz respeito à área da fibra (Figura 27, B) e à área da mielina (Figura 27, C), não observamos diferença significativa, nas respectivas análises, entre os grupos inosina + PLA e salina + PLA.

Quando tratamos da análise da razão-g (Figura 27, D), podemos observar que há uma distribuição ao longo das faixas. Sobretudo, é importante destacar que na razão-g ideal – 0,55 a 0,68 (CHOMIAK E HU, 2009) - o grupo inosina + PLA

apresenta uma diferença significativa no número de fibras presentes nessa faixa ideal, quando comparada ao grupo salina + PLA ($453,8 \pm 45,24 \times 336,6 \pm 37,01$). Assim, com este resultado demonstramos que o reparo com tubo de PLA e o tratamento com inosina impactou positivamente também na remielinização após a lesão por transecção.

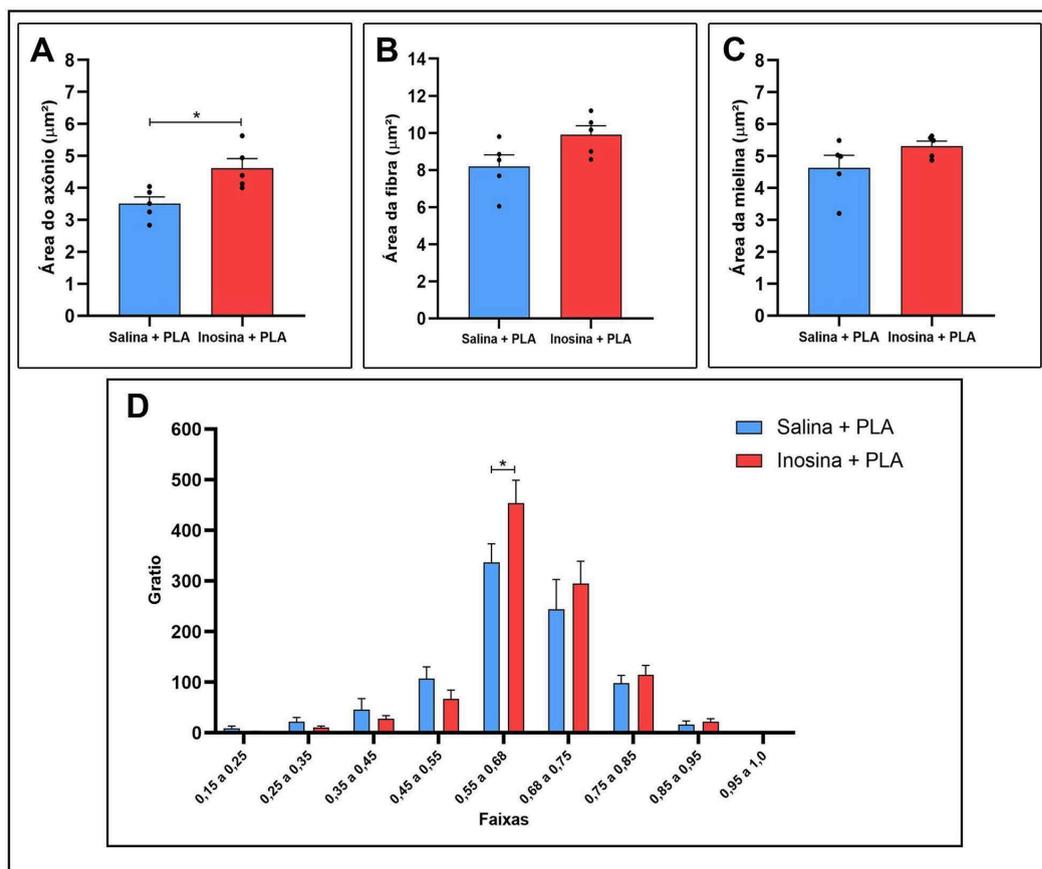


Figura 27: Análise morfométrica dos nervos isquiáticos. A) gráfico área do axônio; B) gráfico área da fibra; C) gráfico área da mielina; D) gráfico razão-g. Grupo salina + PLA (n=5); grupo inosina + PLA (n=5). *p<0,05.

4.2 Imuno-histoquímica para NFH após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina

Para avaliar a regeneração axonal após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina, realizamos uma imuno-histoquímica para NFH e analisamos a área imunomarcada. Ao analisar os cortes transversais no nervo periférico, o grupo inosina + PLA (Figura 28, D-F) aparenta apresentar uma maior imunorreatividade para área marcada quando comparada ao grupo salina + PLA (Figura 28, A-C). Após a quantificação da área imunomarcada para NFH, representada no gráfico (Figura 28, G), observou-se uma diferença significativa entre o grupo inosina + PLA ($0,065 \pm$

0,003) quando comparado ao grupo salina + PLA ($0,037 \pm 0,004$; $**p < 0,01$). Este resultado reforça o potencial da inosina como uma molécula capaz de promover regeneração após lesão e reparo do nervo com tubo PLA.

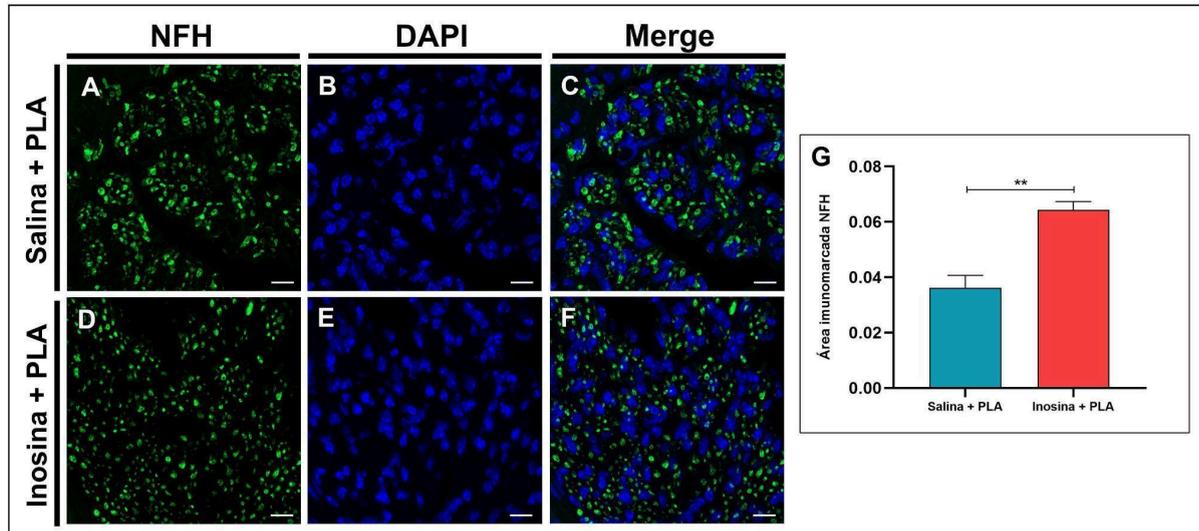


Figura 28: Imunomarcagem para NFH. A) Salina + PLA - NFH ; B) Salina + PLA - DAPI; C) Salina + PLA - Merge; D) Inosina + PLA - NFH; E) Inosina + PLA - DAPI; F) Inosina + PLA - Merge; G) gráfico da quantificação da área imunomarcada para NFH. Salina + PLA (n=3); inosina + PLA (n=3). $** P < 0,01$.

4.3 Imuno-histoquímica para A2AR e MBP após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina

A fim de analisar a localização do receptor A2A nos nervos isquiáticos e avaliar uma possível presença nas CS, realizamos imuno-histoquímica para o receptor A2A e MBP, 8 semanas após a lesão. Ao analisarmos os cortes, observamos que este receptor estava presente tanto nos animais salina (Figura 29, A) quanto nos animais inosina (Figura 29, E). Considerando que a inosina é um agonista deste receptor, quantificamos a área imunomarcada, a fim de analisar qual a influência do tratamento com inosina na expressão desse receptor. Observamos uma maior imunomarcagem relativa nos animais inosina + PLA ($0,078 \pm 0,0037$), comparada aos animais salina + PLA ($0,037 \pm 0,0059$; $**p < 0,01$) (Figura 29, I).

Com relação a marcação para MBP (Figura 29, B e F), observamos uma maior área imunomarcada nos animais inosina + PLA ($0,088 \pm 0,0039$), quando comparados aos animais salina + PLA ($0,048 \pm 0,0042$; $**p < 0,01$) (Figura 29, J). Este dado, encontra-se em concordância com o número total de fibras miélicas encontradas no grupo inosina + PLA.

Por fim, considerando que a MBP é um marcador para mielina, realizamos uma análise de Pearson a fim de avaliar a colocalização entre a A2A e MBP (Figura 30, D, H, K). Nos insertos (Figura 29, D e) podemos observar a colocalização entre as duas marcações (seta branca). A análise de Pearson (Figura 29, K) demonstrou uma forte tendência desta colocalização no grupo inosina + PLA ($0,750 \pm 0,046$), quando comparada com o grupo salina + PLA ($0,512 \pm 0,055$; $*p < 0,05$). Dessa forma, este resultado sugere a presença de receptor A2A nas CS.

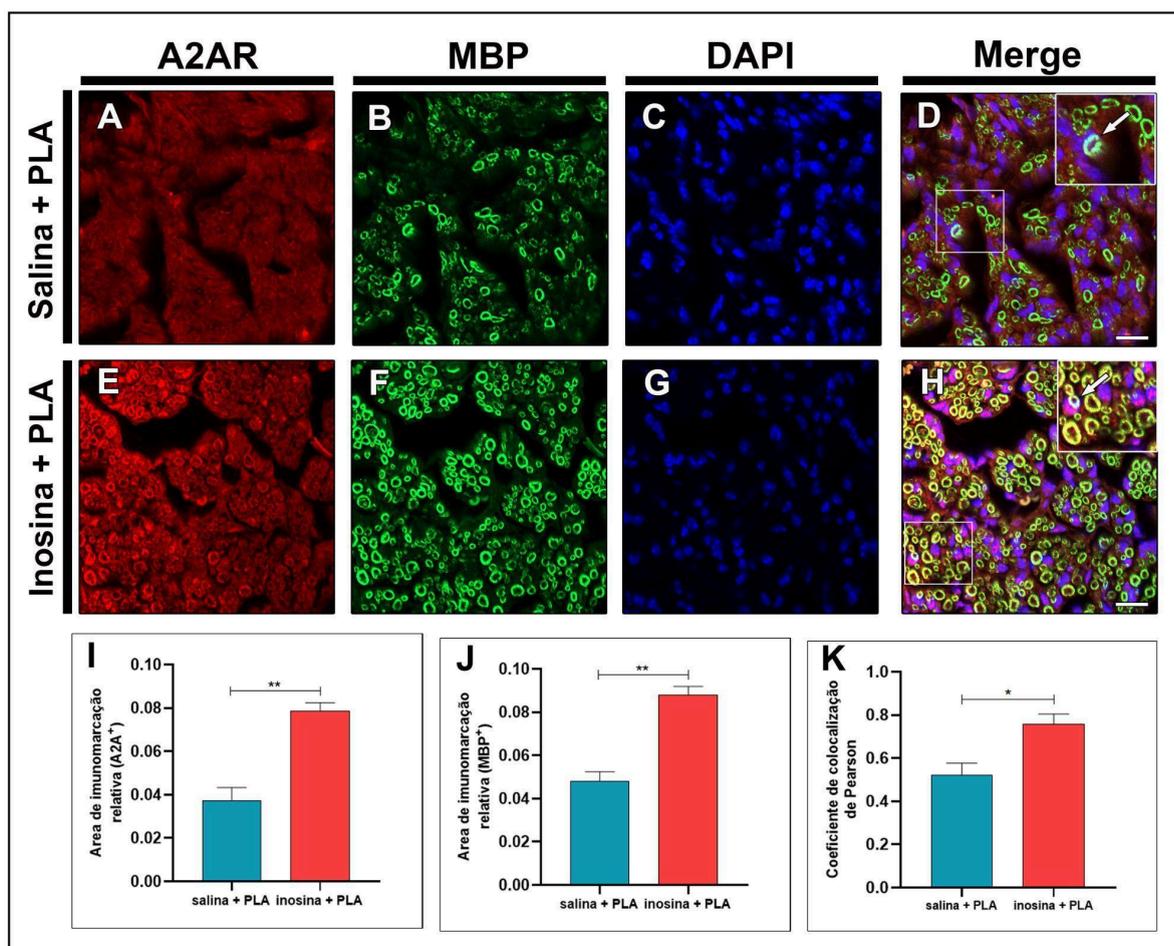


Figura 29: Imuno-histoquímica para A2AR e MBP. A) A2AR salina + PLA; B) MBP grupo salina + PLA; C) DAPI grupo salina + PLA; D) colocalização A2AR e MBP salina + PLA. Setas brancas no insert apontam para a marcação colocalizada; E) A2AR inosina + PLA; F) MBP grupo inosina + PLA; G) DAPI grupo inosina + PLA; H) colocalização A2AR e MBP inosina + PLA. Setas brancas no insert apontam para a marcação colocalizada; I) gráfico imunomarcacão relativa para A2AR; J) gráfico imunomarcacão relativa para MBP; K) Gráfico para o coeficiente de Pearson; salina + PLA (n=3); inosina + PLA (n=3); $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

4.4 Avaliação do peso seco do músculo gastrocnêmio após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina

Para a análise muscular após transecção, reparo com tubo PLA e tratamento com inosina, utilizamos o peso seco dos músculos gastrocnêmios. Para fins de comparação, utilizamos o gastrocnêmio do lado contralateral à lesão nos grupos inosina e salina (Figura 30, A e B). Como esperado, o gráfico (Figura 30, C) demonstra que quando comparamos os gastrocnêmios do lado lesado e contralateral no grupo salina ($0,075 \pm 0,0059 \times 0,158 \pm 0,0035$; $\text{§§§ } p < 0,001$), é possível observar uma diminuição no peso seco no lado lesado. O mesmo ocorre quando comparamos os músculos do lado lesado e contralateral no grupo inosina ($0,099 \pm 0,0037 \times 0,152 \pm 0,0052$; $\text{### } p < 0,001$), sugerindo que em ambos os grupos, a gravidade da lesão promove uma atrofia dos gastrocnêmios. Quando comparamos os gastrocnêmios do lado lesado do grupo inosina + PLA com os do grupo salina + PLA ($0,099 \pm 0,0037 \times 0,075 \pm 0,0059$; $\text{* } p < 0,05$), podemos observar uma menor perda de massa muscular no grupo inosina + PLA. Observamos também, que a razão (%) entre o peso seco (Figura 30, D) do grupo inosina + PLA/contralateral é significamente maior que no grupo salina + PLA/contralateral ($64,8 \pm 3,87 \times 49,6 \pm 4,03$; $\text{* } p < 0,05$). Esse resultado sugere que o tratamento com inosina atenuou a perda de massa muscular.

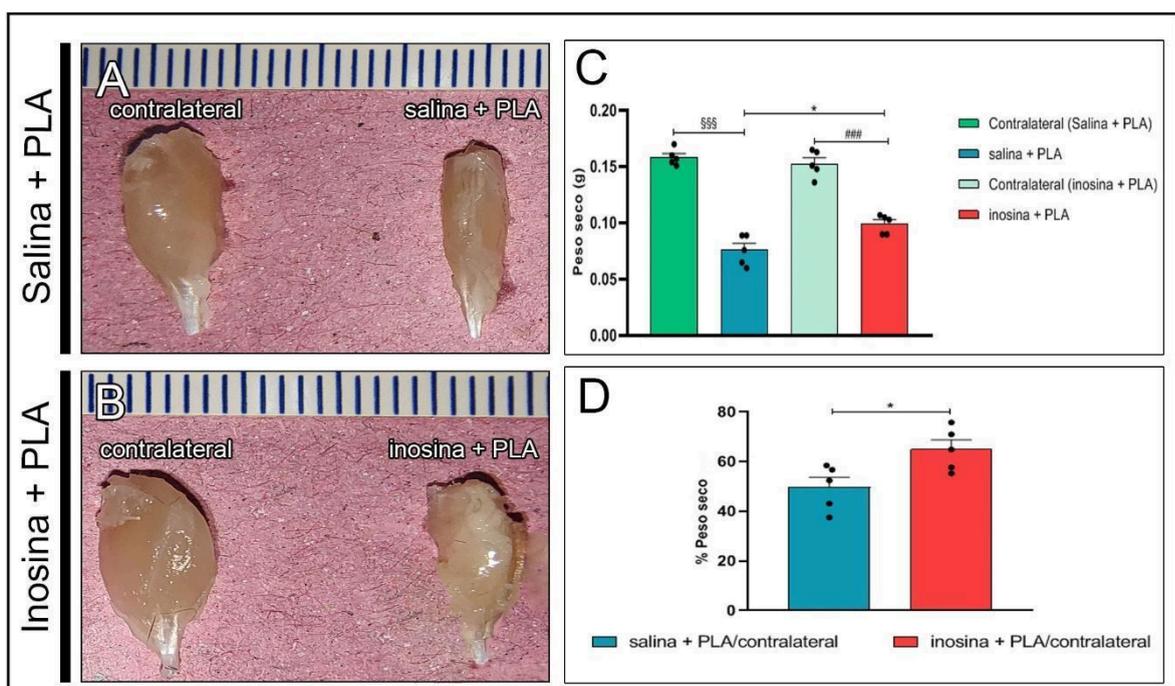


Figura 30: Análise do peso seco do músculo gastrocnêmio. A) músculos gastrocnêmios lado contralateral e lesado salina + PLA; B) músculos gastrocnêmios lado contralateral e lesado inosina + PLA; C) Gráfico demonstrando a diferença entre os pesos secos dos músculos gastrocnêmios nos lados contralaterais à lesão (lado esquerdo), grupo salina + PLA e grupo inosina + PLA; D) razão em % entre contralateral/salina + PLA e contralateral/inosina + PLA. Contralateral (n=5/grupo); salina + PLA (n=5); inosina + PLA (n=5). *p<0,05 (salina + PLA x inosina + PLA); ### p<0,001 (contralateral x salina + PLA); §§§§ p<0,001 (contralateral x inosina + PLA).

4.5 Morfologia e quantificação das JNM

Para avaliar a quantidade e morfologia das JNM nos músculos reinervados dos animais submetidos ao reparo com tubo PLA e tratamento com inosina, 8 semanas após a lesão, utilizamos a marcação para terminal pós-sináptico com α -bungarotoxina, (Figura 31, A e B) e quantificamos o número total de JNMs (Figura 31, C) e a quantidade de JNMs que apresentavam a morfologia ideal em “pretzel” (Figura 31, D). Com relação a quantificação das JNM, notamos que o grupo inosina + PLA apresenta uma quantidade significativamente maior quando comparado ao grupo salina ($199 \pm 7,79$ x $156 \pm 3,97$; ** p<0,01) como observado no gráfico (Figura 31, C). Em ambos os grupos é possível observar a típica forma de “pretzel” (Figura 31, seta branca). Porém, a quantificação de JNMs que apresentam essa morfologia demonstrou que o grupo inosina + PLA apresenta uma maior presença de JNM nessa morfologia, quando comparada ao grupo salina + PLA ($67 \pm 1,74$ x $49 \pm 3,83$; ** p<0,01).

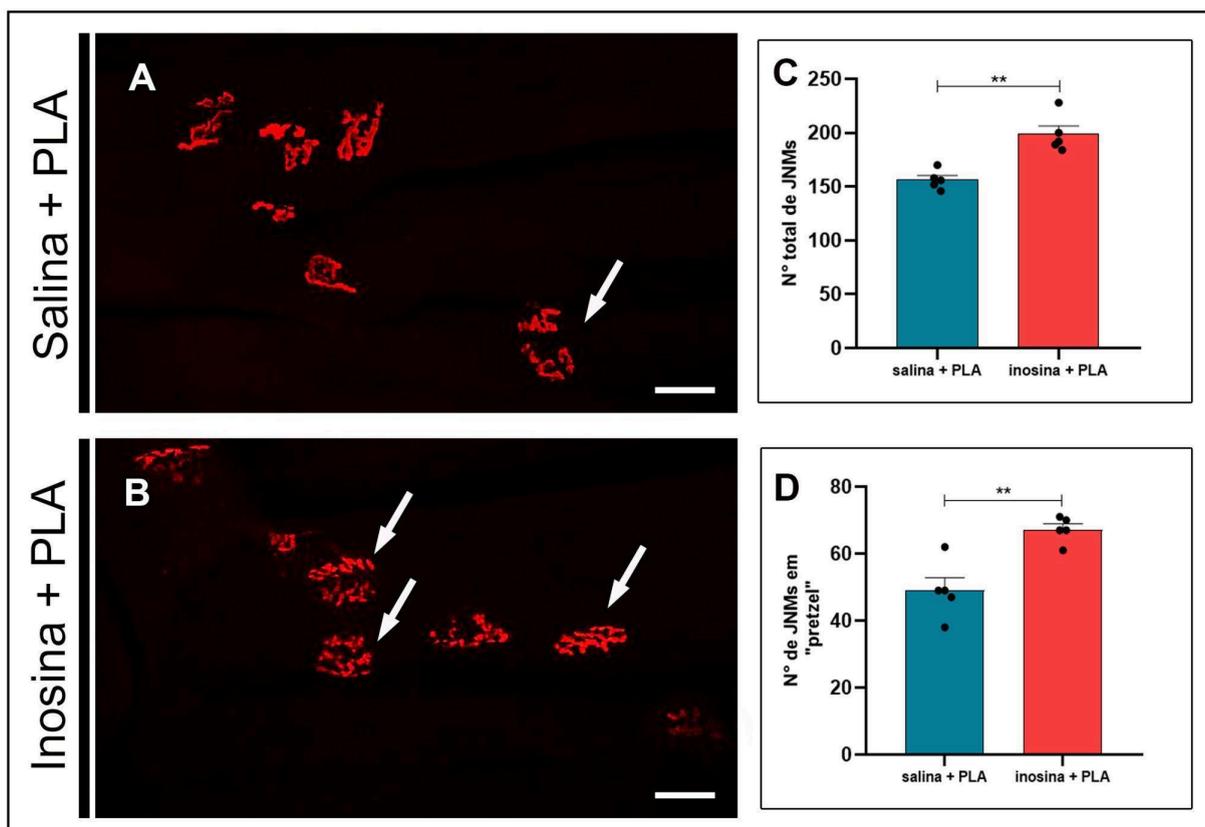


Figura 31: Análise das JNM nos músculos gastrocnêmios. A) JNMs no grupo salina + PLA; B) JNMs no grupo inosina + PLA. As setas em ambas as figuras, indicam JNM com morfologia de "pretzel"; C) gráfico número total de JNM. D) gráfico número de JNM em morfologia de "pretzel". Salina + PLA (n=5); inosina + PLA (n=5). ** P<0,01

4.6 Avaliação da recuperação da função motora e sensitiva após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina

Para análise da recuperação da função motora após transecção de nervo isquiático e reparo com PLA e tratamento com inosina, realizamos o IFI durante 8 semanas (Figura 32, A e B). Analisando de forma qualitativa a marcação das patas dos animais (Figura 32, A), podemos observar que a pata direita dos animais inosina + PLA apresentam uma melhora na marcação, quando comparados com os animais salina + PLA na oitava semana. O gráfico (Figura 32, B) demonstra como esperado que o grupo inosina + PLA apresenta a partir da segunda semana uma recuperação da função motora, quando comparado ao grupo salina + PLA ($-75,59 \pm 3,06$ x $-93,65 \pm 2,72$; * $p < 0,05$), sendo mantida até a oitava semana ($-58,49 \pm 2,24$ x $-78,04 \pm 3,82$; ** $p < 0,01$).

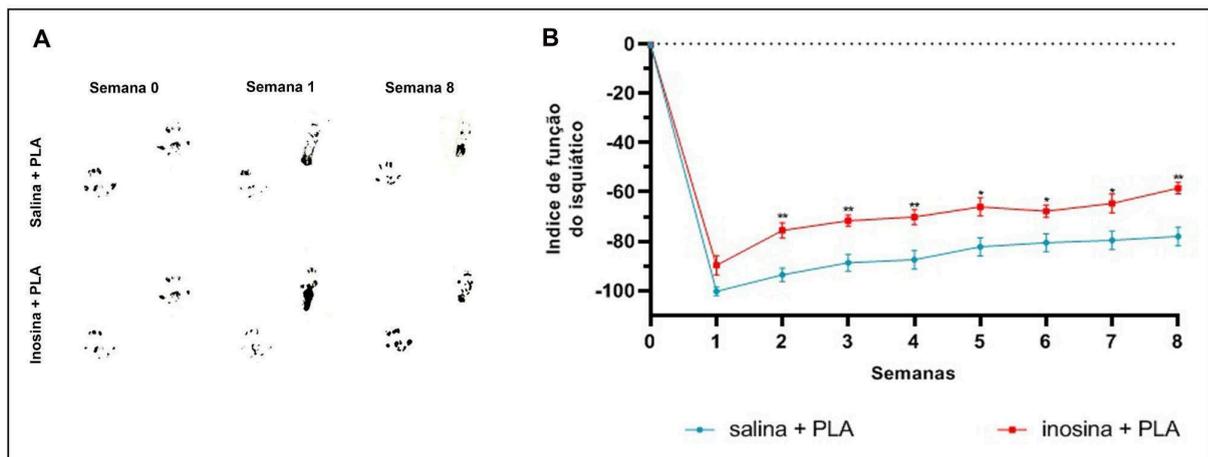


Figura 32: Análise da recuperação motora. A) marcação das patas direita e esquerda nas semanas 0, 1 e 8; B) gráfico do IFI; Salina + PLA (n=5); Inosina + PLA (n=5); * p< 0,05; ** p< 0,01. Linha pontilhada representa os valores de normalidade.

Para analisar a sensibilidade tátil após a lesão, reparo com PLA e tratamento com inosina, utilizamos o analgesímetro (Figura 33). Na primeira e segunda semanas após a lesão, observamos uma total perda de sensibilidade tátil em ambos os grupos. Porém a partir da terceira semana, podemos observar que os animais do grupo inosina + PLA apresentam recuperação significativa do tato, quando comparados ao grupo salina + PLA ($1,78 \pm 0,111 \times 2,56 \pm 0,08$; $***p < 0,001$). A recuperação da sensibilidade tátil no grupo inosina + PLA permanece maior até a sétima semana ($0,58 \pm 0,03 \times 0,98 \pm 0,12$; $*p < 0,01$). A partir da oitava semana, não há diferença estatística significativa entre os grupos. Note, que todos os animais do grupo inosina + PLA na oitava semana atingem a recuperação total da função, o que não se observa no grupo salina.

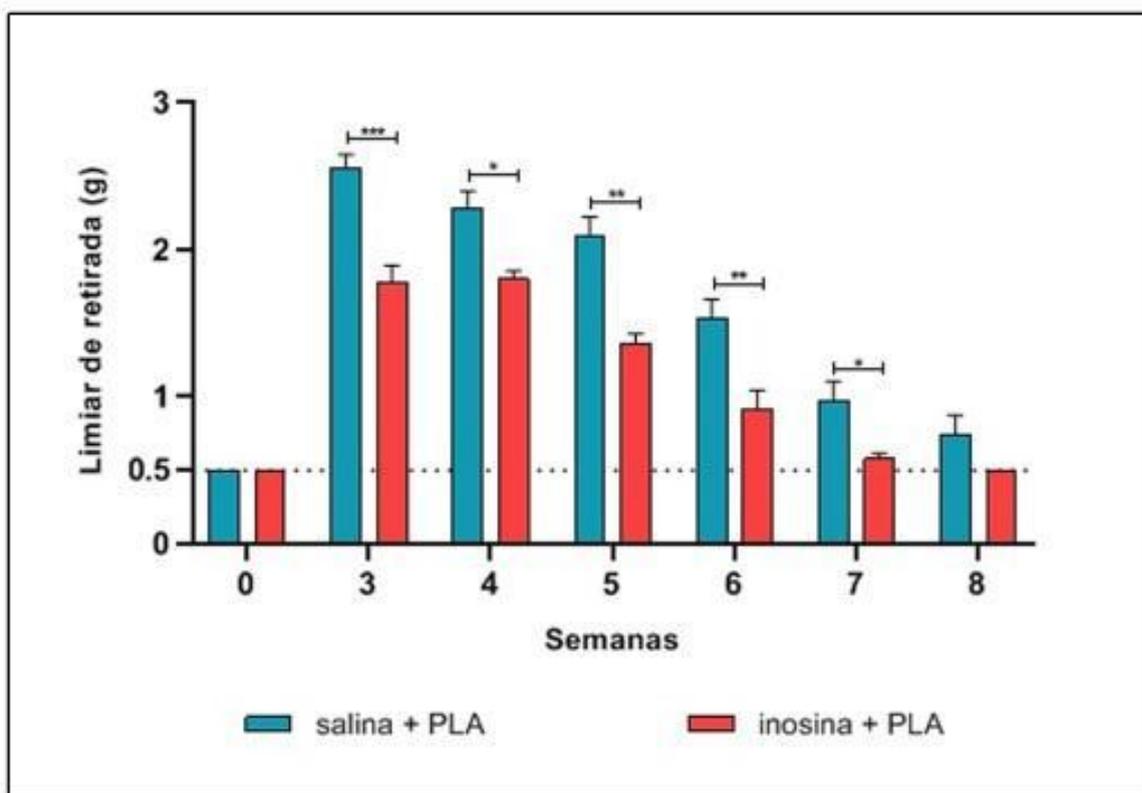


Figura 33: Análise da recuperação da sensibilidade tátil. Gráfico apresentando os resultados obtidos durante para o limiar de retirada em gramas. Salina + PLA (n=5); Inosina + PLA (n=5); * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p<0,001. Linha pontilhada representa os valores de normalidade.

Para análise da sensibilidade dolorosa após transecção, reparo com PLA e tratamento com inosina, utilizamos o teste da picada do alfinete (Figura 34). Na primeira semana após a lesão, observamos uma total perda de sensibilidade dolorosa em ambos os grupos. Porém, na segunda semana após a lesão, podemos observar que alguns animais em ambos os grupos, apresentam uma resposta à dor, porém sem diferença significativa. Entretanto, a partir da terceira semana, o grupo inosina + PLA apresenta uma recuperação significativa, quando comparado com o grupo salina + PLA ($2,2 \pm 0,2$ x $0,8 \pm 0,37$; ***p<0,001). Esta recuperação da sensibilidade dolorosa segue até a sexta semana ($4,6 \pm 0,24$ x $3,2 \pm 0,37$; *p<0,001), onde a partir da sétima semana, não se encontra mais diferença estatística significativa. Note que similar ao analgésímetro, todos os animais do grupo inosina + PLA na oitava semana atingem a recuperação total da função, o que não se observa no grupo salina.

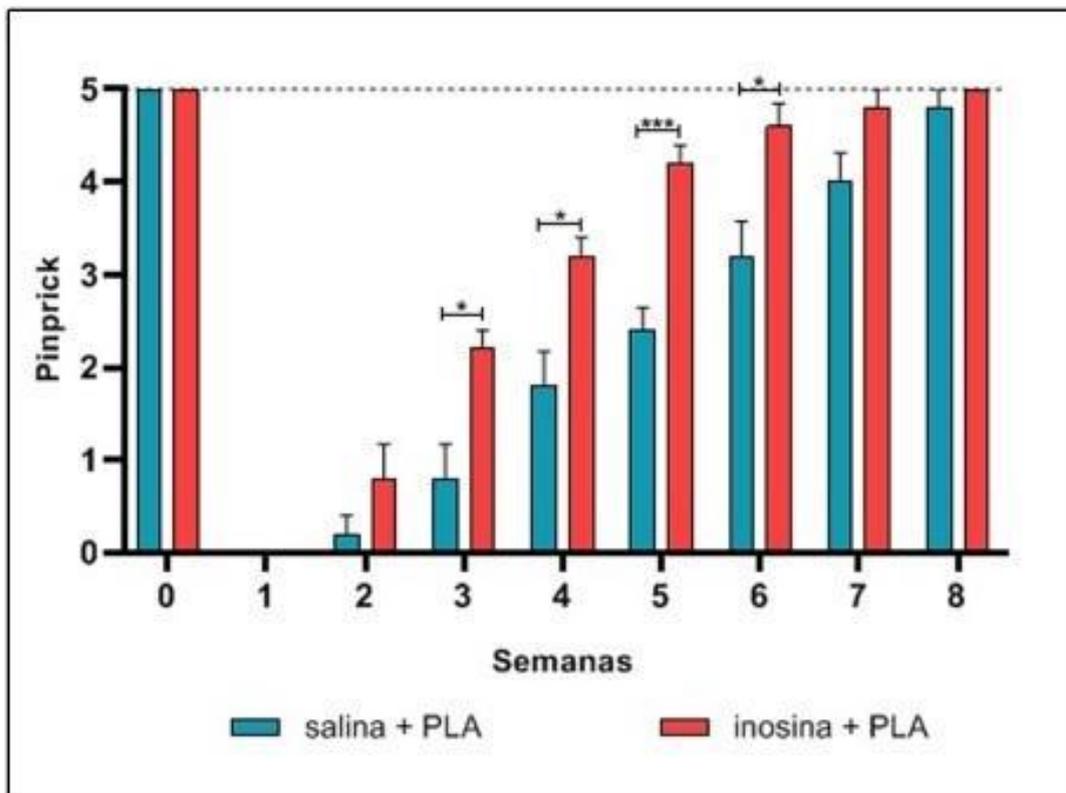


Figura 34: Análise da recuperação da sensibilidade dolorosa. Gráfico apresentando a pontuação obtida no pinprick test. Salina + PLA (n=5); Inosina + PLA (n=5); * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p<0,001. Linha pontilhada representa os valores de normalidade.

4.7 Avaliação da amplitude do PAMC, latência do potencial de ação e velocidade de condução do nervo após reparo com tubo PLA e tratamento com inosina

Para a análise da regeneração axonal na oitava semana após transecção, reparo com PLA e tratamento com inosina, realizamos a eletroneuromiografia. Primeiramente, ao analisar as curvas obtidas no software é possível notar que o grupo salina + PLA apresenta uma clara redução na amplitude do PAMC, quando comparados aos grupos de animais normal e inosina + PLA (Figura 35, A-C). No gráfico (Figura 35, D), quando comparamos a amplitude do PAMC nos animais do grupo normal com os animais do grupo salina + PLA, esta redução é estatisticamente significativa ($27,48 \pm 1,97$ x $11,96 \pm 1,7$;### p<0,01). Porém, ao contrário do observado no grupo salina + PLA, quando comparamos os animais normais com os animais do grupo inosina + PLA, não se observa diferença entre os

grupos ($27,48 \pm 1,97$ x $21,20 \pm 1,81$; ns). Por último, ao comparar os grupos inosina + PLA e salina + PLA, observamos uma diferença estatística significativa ($21,20 \pm 1,81$ x $11,96 \pm 1,7$; * $p < 0,05$). Assim, com os resultados observados na análise da amplitude do PAMC e a diferença observada na contagem de fibras mielínicas (Figura 35, C), é possível confirmar que a inosina + PLA é capaz de estimular e promover uma maior regeneração axonal.

A seguir, tendo observado uma maior regeneração nos animais inosina + PLA, nosso próximo passo foi analisar através da latência do PACM e da velocidade de condução do nervo, o estado eletrofisiológico da remielinização após a lesão. No gráfico (Figura 35, E), quando comparamos a latência do PAMC nos animais do grupo normal com os animais do grupo salina + PLA, é possível observar um aumento significativo ($7,3 \times 10^{-3} \pm 3,3 \times 10^{-5}$ x $1 \times 10^{-2} \pm 5 \times 10^{-5}$; ** $p < 0,01$), diferente de quando comparamos os animais normais, com os animais do grupo inosina ($7,3 \times 10^{-3} \pm 3,3 \times 10^{-5}$ x $7,8 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-5}$; ns). Quando comparados, o grupo inosina + PLA como esperado, apresenta uma diferença estatística significativa em relação ao grupo salina + PLA ($7,8 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-5}$ x $1 \times 10^{-2} \pm 5 \times 10^{-5}$; ** $p < 0,01$). O mesmo cenário se repete quando comparamos a VCN (Figura 35, F) entre os grupos normal e salina + PLA ($31,67 \pm 0,66$ x $19,42 \pm 0,92$), normal e inosina + PLA ($31,67 \pm 0,66$ x $30,64 \pm 1,51$) e inosina + PLA e salina + PLA ($30,64 \pm 1,51$ x $19,42 \pm 0,92$). Essa diferença entre os grupos inosina + PLA e salina + PLA, somado ao maior número de fibras dentro da faixa ideal da razão-g (Figura 26, H) e de uma maior imunomarcagem para MBP (Figura 30, H), demonstra que a inosina estimula não só a regeneração, mas também a mielinização, visto que há uma normalização da latência do PAMC e uma maior VCN.

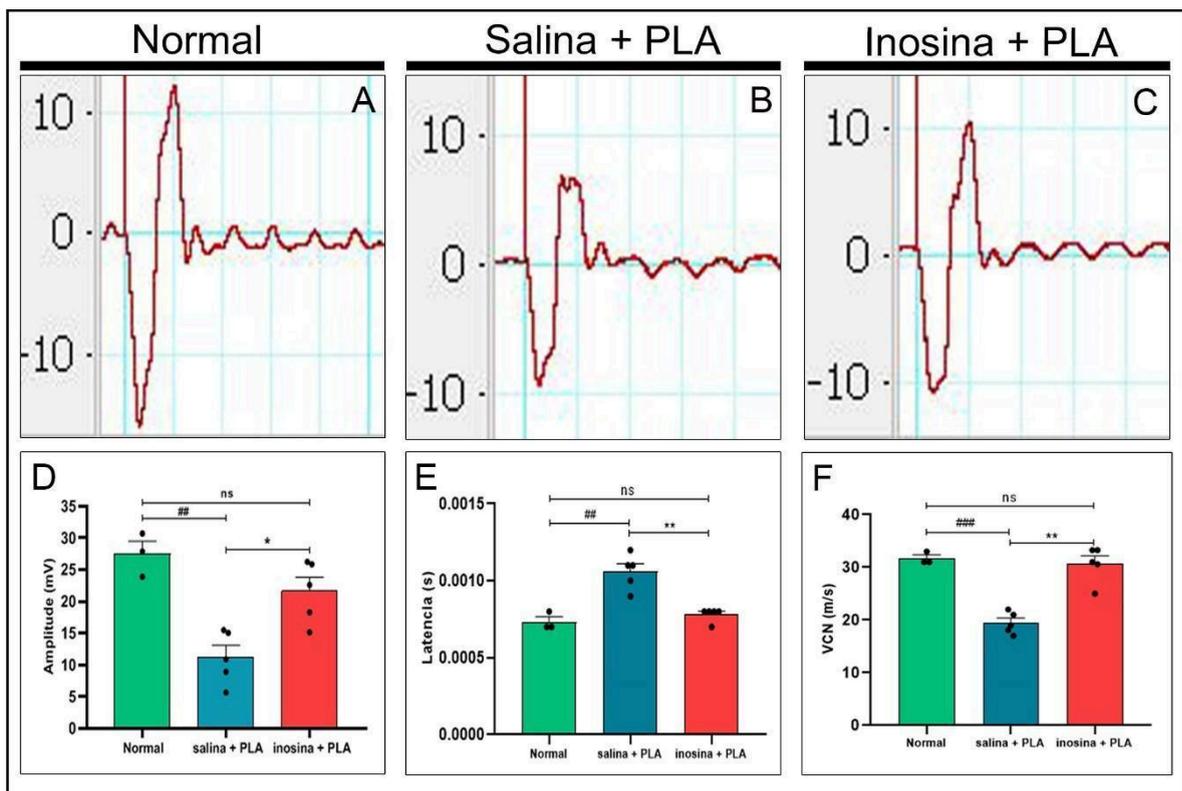


Figura 35: Análise da amplitude e latência do PAMC e VCN. Ondas do PAMC dos grupos normal (A), salina + PLA (B) e inosina + PLA (C). D) gráfico da análise da amplitude do PAMC; E) gráfico da análise da latência do PAMC; F) gráfico da VCN. Contralateral (n=3); grupo salina + PLA (n=5); grupo inosina + PLA (n=5). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (salina + PLA x inosina + PLA); ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ (contralateral x salina + PLA); ns (normal x inosina + PLA).

5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial regenerativo do tratamento com inosina, após lesão por transecção de nervos isquiáticos de camundongos (**neurotmesa – grau V**). Neste tipo de lesão traumática, o grau de gravidade é elevado (para revisão, tópico **1.4** da introdução). Além disso, representa um desafio para a maquinaria de regeneração dos neurônios e do potencial de reparo das CS. Portanto, para que os axônios em regeneração no coto proximal atinjam o coto distal e alcancem seus alvos para formar novas sinapses, é necessário um reparo do nervo. Neste trabalho, os animais tiveram seus nervos transecionados e tubulizados, e uma distância de 3 mm entre os cotos foi mantida, a fim de aumentar o desafio para a regeneração. Para o reparo, utilizamos o tubo de PLA, pois trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que este tubo é uma alternativa viável para o reparo, devido a diversos benefícios quando comparado

com outras técnicas de reparo e inclusive entre outros tipos de tubos biodegradáveis (GOULART *et al.*, 2016; PESTANA *et al.*, 2018; DURÇO *et al.*, 2020). Após o reparo, os animais foram tratados 1 hora após a lesão com salina e inosina através de uma injeção intraperitoneal e foram submetidos a testes funcionais que mostraram uma maior recuperação da função motora e recuperação da função sensitiva, além de uma amplitude do PAMC próxima da normalidade, uma menor latência para deflagração do potencial de ação e maior velocidade de condução do nervo na ENMG. Esta recuperação significativa do grupo inosina + PLA quando comparada com os resultados obtidos no grupo salina + PLA, são explicadas por um microambiente mais organizado, por uma maior quantidade de fibras mielínicas e uma maior quantidade de fibras mielínicas dentro da razão-g ideal, indicando uma melhor mielinização neste grupo.

A despeito do SNP apresentar um potencial regenerativo e em modelos animais a sua regeneração culminar em recuperação funcional considerável, é conhecido que alguns fatores como idade, distância do local da lesão ao órgão alvo – acrescenta-se nessa problemática, o comprimento do membro – e por último o tipo de lesão, são determinantes para o sucesso da regeneração. Para traçar um modelo de lesão, deve-se levar em consideração esses fatores, pois são condições não modificáveis e impactam diretamente no resultado a ser obtido (ALLODI, UDINA E NAVARRO, 2012; IRISARRI, 2023).

Entretanto, apesar de fatores não modificáveis definirem o sucesso da regeneração e conseqüente recuperação funcional, estes fatores podem ser atenuados por diversos meios. Por ser um modelo dependente de reparo do nervo, optar pelo uso dos enxertos tubulares biodegradáveis é uma opção viável, por apresentar menor risco de neuroma, fibrose e rejeição. Neste cenário, o tubo de PLA além de fornecer as vantagens citadas, apresenta tempo de degradação e espessura ideais, permitindo que suas características mecânicas sejam preservadas prevenindo colapamento do tubo, além de também apresentar porosidade ideal para troca de nutrientes e oxigênio com o meio. Dessa forma, optar pelo uso do tubo de PLA permite uma melhor organização das fibras, mantendo-as dentro da sua luz, além de guiar as fibras em regeneração até seu alvo correto (GOULART *et al.*, 2016; PESTANA *et al.*, 2018; DURÇO *et al.*, 2020). Somado ao uso do tubo de PLA como estratégia de reparo, as terapias moleculares têm se tornado cada vez mais uma opção para tratamento de lesões no SN. Entre elas, o uso da inosina surge como

opção viável. Nosso grupo, utilizando o modelo de esmagamento de nervo isquiático, demonstrou que a inosina, promoveu a aceleração da regeneração, modulação do microambiente inflamatório e neuroproteção, acarretando em recuperação funcional significativa (CARDOSO *et al.*, 2019). Baseado nestes resultados apresentados pelo tratamento com inosina, optamos por progredir a gravidade da lesão, realizando uma lesão por transecção e reparo com o tubo de PLA e tratamento intraperitoneal com inosina, e dessa forma potencializar e viabilizar uma regeneração de sucesso.

É consenso que para atingir uma boa recuperação funcional após a lesão, é preciso que ocorra uma robusta regeneração axonal. Porém, deve-se levar em conta que a organização das fibras é crucial para uma regeneração eficaz. Considerando que uma das principais finalidades do tubo é auxiliar na organização das fibras nervosas e direcioná-las para o órgão alvo, podemos concluir que o tubo PLA foi capaz de formar fascículos e direcionar as fibras em regeneração, como observado no grupo salina + PLA, e como visto anteriormente por GOULART e colaboradores (2016) e PESTANA e colaboradores (2018). Contudo há de se considerar que o microambiente do grupo tratado com inosina apresenta uma maior organização comparado ao grupo salina + PLA, devido principalmente a organização concêntrica do perineuro. Os fibroblastos, linhagem celular responsável pela formação de matriz extracelular e componente do perineuro, apresenta em sua superfície o receptor A2A (SHAIKH E CRONSTEIN, 2016). Dessa forma, sugere-se que os fibroblastos respondam ao tratamento com inosina e justifique portanto esta melhor organização.

A fim de analisar o grau de regeneração e a angiogênese após o reparo com tubo PLA e tratamento com inosina, quantificamos o número total de fibras mielínicas e o número de vasos sanguíneos, e observamos que o grupo inosina + PLA, além da melhor organização do microambiente, apresenta uma maior quantidade de fibras mielínicas e maior quantidade de vasos sanguíneos. O tratamento com inosina neste modelo mais grave de lesão nervosa, está em conformidade com o que foi observado tanto em lesão por hemissecção da medula espinal (KIM *et al.*, 2013), modelo com elevado grau de gravidade, quanto no tratamento em lesão por esmagamento (CARDOSO *et al.*, 2019). Além disso, tanto nos cortes semifinos, quanto nos ultrafinos é possível observar uma maior área dos axônios no grupo dos animais que receberam inosina como tratamento. A análise morfométrica dos nervos, confirma a maior área dos axônios no grupo inosina +

PLA. Porém não encontramos diferença na análise da área da fibra e da mielina. Contudo, apesar dessa observação, a análise da razão-g, um dado que diz respeito à eficácia da mielinização, e com razão ideal entre 0,55 a 0,68 nos nervos isquiáticos (CHOMIAK E HU, 2009), demonstra que a maioria das fibras no grupo inosina + PLA encontram-se dentro dessa faixa. Diferente dos progenitores de oligodendrócitos (OPCs), é possível detectar nas CS apenas os receptores A2A e A2B (FIELDS, 2006).

A fim de investigar a presença do receptor A2A nos nervos e avaliar uma possível localização nas CS, realizamos uma dupla marcação para o receptor A2A e MBP, após o reparo e tratamento com inosina. Nesse contexto pós lesão, observamos que o grupo inosina + PLA, apresenta uma maior marcação tanto para o receptor A2A e quanto para MBP. Notamos inclusive que algumas marcações para o receptor A2A, apresentam uma semelhança à marcação da MBP, e que ao unir as duas marcações, observa-se uma colocação entre elas, o que é confirmado pela análise do coeficiente de Pearson, cujo reforça uma forte tendência à colocação entre essas duas marcações no grupo inosina + PLA, quando comparada com o grupo salina + PLA. A respeito da maior presença de receptor A2A, situações de estresse elevam os níveis de inosina e conseqüentemente dos receptores A2A (WELIHINDA *et al.*, 2016). Além disso, outra possibilidade que suporta esses níveis elevados de receptor A2A nos nervos do grupo inosina + PLA, deve-se ao tratamento exógeno de inosina. Entretanto, considerando que oito semanas após o tratamento os níveis de receptores A2A permanecem elevados, hipotetiza-se que decorra de uma manutenção da expressão deste receptor no grupo inosina + PLA, diferindo do que observamos no grupo salina + PLA, onde estes níveis encontram-se reduzidos. Outro fato a se considerar, diz respeito a presença deste receptores nas CS. STEVENS e colaboradores (2004) demonstraram que durante o desenvolvimento, a mielinização de axônios eletricamente ativos é estimulada após a ligação da adenosina ou de um dos seus agonistas ao receptor A2A nas CS de fenótipo mielinico que cercam estes axônios. Entretanto, a atuação dos receptores A2A sobre as CS é desconhecida. Nossos resultados sugerem que após a lesão, o tratamento com inosina estimulou os receptores A2A presentes nas CS, levando dessa forma a uma melhor mielinização dos axônios regenerados, como evidenciado na maior marcação para MBP, além de uma maior quantidade de fibras mielínicas presentes na faixa ideal do g-ratio. Além disso, dada a sua presença nas

CS, é necessário investigar se durante a fase degenerativa, a inosina e o receptor A2A interferem na reprogramação gênica das CS e conseqüentemente antecipam a progressão da degeneração.

Em seguida, para analisar quais as conseqüências do reparo do nervo e o tratamento com inosina no músculo gastrocnêmio, realizamos uma análise do peso seco dos músculos e da morfologia e viabilidade das JNM. É consenso que quanto maior o tempo de desnervação do músculo após uma lesão nervosa, determina o grau de atrofia muscular, e conseqüentemente ocasiona a perda da viabilidade das JNMs, decorrente da degeneração das mesmas (SULAIMAN E GORDON, 2000; LI *et al.*, 2020). Em um modelo de transecção, que representa um grau de comprometimento elevado, com necessidade de reparo e, portanto, um maior tempo de desnervação, é esperado que estes músculos sofram um maior grau de atrofia, o que observamos em ambos os grupos ao analisar o peso seco do músculo gastrocnêmio. Porém, o grupo inosina + PLA apresenta um maior peso seco, quando comparados com o grupo salina + PLA, inclusive quando normalizado pelo seu lado contralateral. Isso representa uma menor perda ponderal de massa muscular. Quando analisamos as JNMs, observamos uma maior quantidade, além de uma maior preservação da sua morfologia ideal em “pretzel” no grupo inosina + PLA. Este resultado demonstra que o tratamento com a inosina, é capaz de diminuir o tempo de inatividade do músculo gastrocnêmio, devido a promoção da regeneração axonal, o que possibilita a formação de novas sinapses funcionais com as JNMs remanescentes, preservadas dessa forma pelo menor tempo de desnervação (LI *et al.*, 2020). Nossos resultados são comparados ao observado por DURÇO e colaboradores (2020), onde a terapia combinada entre células tronco derivadas do tecido adiposo humano e reparo com tubo PLA, foi capaz de reduzir a atrofia muscular, além de garantir maior viabilidade e preservação da morfologia das JNM (DURÇO *et al.*, 2020).

A respeito dos resultados da eletroneuromiografia e dos testes funcionais, estes encontram-se em consonância com os resultados obtidos nas análises morfológicas. Na eletroneuromiografia, podemos observar que o grupo inosina + PLA além de apresentar uma maior amplitude do PAMC, latência e velocidade de condução em quando comparados ao grupo salina + PLA, observamos que esses valores se aproximam dos valores observados nos animais sem lesão. Este dado é um dado significativo, pois confirma o que foi observado tanto na contagem do

número total de fibras mielínicas, quanto na análise da razão-g. Este dado reforça o papel desempenhado pela inosina na promoção de regeneração, como observado anteriormente no tratamento de lesões no SNC (BENOWITZ *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2013), além do que observamos após uma lesão por esmagamento (CARDOSO *et al.*, 2019). Todos os resultados observados neste trabalho, representam e justificam os resultados encontrados na análise da recuperação funcional, visto que os animais do grupo inosina + PLA apresentam uma recuperação acelerada e total da sensibilidade tanto dolorosa (pin prick test), quanto da sensibilidade tátil protopática (analgesímetro), quando comparados ao grupo salina. Em relação ao IFI, a recuperação deste não é próxima a sua normalidade, porém se aproxima de sua passada normal. Analisando considerando a biomecânica, este animal tornaria sua marcha e suas atividades de vida diária, mais funcionais que os animais do grupo salina. PESTANA e colaboradores (2018), demonstraram em uma análise comparativa de 3 tipos de tubos, que o tubo de PLA por si, foi capaz de promover a recuperação da sensibilidade após a lesão. Porém, a respeito da função motora, o mesmo não foi capaz de apresentar uma recuperação avançada. Em nosso trabalho, o grupo salina + PLA, que representa os dados previamente descritos (PESTANA, *et al.*, 2018), apresenta como única diferença, uma recuperação próxima a normalidade da função sensitiva. Contudo, o grupo inosina + PLA, demonstra uma antecipada e total recuperação da função sensitiva e uma recuperação robusta da função motora. Esses resultados estão de acordo com o observado anteriormente em trabalhos que analisam a recuperação funcional de animais tratados com inosina, tanto no SNC (ZAI *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2013; DACHIR *et al.*, 2014), quanto no SNP (CARDOSO *et al.*, 2019).

Entretanto, apesar da inosina estimular uma maior regeneração no grupo inosina + PLA, a recuperação da função motora não é completamente atingida, diferente do que é observado na recuperação da função sensitiva. Estes resultados reforçam que neste tipo mais grave de lesão, o reparo e o tratamento, apesar de apresentar respostas positivas, ainda não possibilitam a recuperação próximo ou total da função motora. Dessa forma, é possível investigar diversas soluções para essa problemática. Uma delas é a utilização de recursos manuais, utilizados na fisioterapia, como mobilização neural, a fim de estimular a mobilidade do nervo, além de favorecer a diminuição de fibroses, fator conhecido como obstáculo para a

regeneração deste modelo. Outro recurso que apresenta resultados notáveis na recuperação da função motora é a combinação entre tratamento e protocolo de exercícios aeróbicos. GOULART e colaboradores (2014) observaram que a associação entre com tubo de policaprolactona, enxerto de CS, e inserção num protocolo de exercícios aeróbicos, apresentaram uma melhor regeneração e consequente recuperação da função motora, comparado ao grupo que realizou o protocolo de exercícios, porém sem enxerto de CS. Investigar a associação do tratamento com inosina e exercício aeróbico, torna-se uma opção com perspectiva de potencialização dos resultados observados apenas com o tratamento com inosina.

6. CONCLUSÃO

O estudo mostrou que a associação do reparo do nervo com PLA, e o tratamento intraperitoneal com inosina uma hora após a lesão e durante 7 dias, promove uma robusta regeneração, além de estimular a angiogênese, resultando em uma menor perda ponderal de massa muscular nos músculos gastrocnêmios, além de apresentar uma maior quantidade de JNMs, tanto em quantidade, quanto em morfologia ideal em “pretezel”. Além disso, observamos uma maior organização do microambiente e uma melhor mielinização das fibras nervosas. Observamos um aumento dos receptores A2A no microambiente, sugerindo que os melhores resultados observados no grupo inosina, tem relação com o aumento desse receptor. Por fim, a eletroneuromiografia confirma a maior regeneração e mielinização observada no grupo inosina, refletindo em uma melhor recuperação das funções motora e sensitiva dos animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRIS, A. S.; KOLIATSOS, V. E. NAD⁺, Axonal Maintenance, and Neurological Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, 39, n. 16, p. 1167-1184, 2023.

ALLODI, I.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. **Progress in neurobiology**, 98, n. 1, p. 16-37, 2012.

ARTHUR-FARRAJ, P. J.; LATOUCHE, M.; WILTON, D. K.; QUINTES, S.; CHABROL, E.; BANERJEE, A.; WOODHOO, A.; JENKINS, B.; RAHMAN, M.; TURMAINE, M. c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. **Neuron**, 75, n. 4, p. 633-647, 2012.

ARTHUR-FARRAJ, P.; WANEK, K.; HANTKE, J.; DAVIS, C. M.; JAYAKAR, A.; PARKINSON, D. B.; MIRSKY, R.; JESSEN, K. R. Mouse schwann cells need both NRG1 and cyclic AMP to myelinate. **Glia**, 59, n. 5, p. 720-733, 2011.

ASLAM, M.; LADILOV, Y. Emerging role of cAMP/AMPK signaling. **Cells**, 11, n. 2, p. 308, 2022.

BABETTO, E.; BEIROWSKI, B. Of axons that struggle to make ends meet: Linking axonal bioenergetic failure to programmed axon degeneration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, 1863, n. 5, p. 148545, 2022.

BABETTO, E.; WONG, K. M.; BEIROWSKI, B. A glycolytic shift in Schwann cells supports injured axons. **Nature neuroscience**, 23, n. 10, p. 1215-1228, 2020.

BEIROWSKI, B.; NÓGRÁDI, A.; BABETTO, E.; GARCIA-ALIAS, G.; COLEMAN, M. P. Mechanisms of axonal spheroid formation in central nervous system Wallerian degeneration. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, 69, n. 5, p. 455-472, 2010.

BENOWITZ, L. I.; GOLDBERG, D. E.; MADSEN, J. R.; SONI, D.; IRWIN, N. Inosine stimulates extensive axon collateral growth in the rat corticospinal tract after injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96, n. 23, 1999.

BOERBOOM, A.; DION, V.; CHARLOT, A.; FRANZEN, R. Molecular mechanisms involved in Schwann cell plasticity. **Frontiers in molecular neuroscience**, 10, p. 38, 2017.

BOLÍVAR, S.; NAVARRO, X.; UDINA, E. Schwann cell role in selectivity of nerve regeneration. **Cells**, 9, n. 9, p. 2131, 2020.

BOREA, P. A.; GESSI, S.; MERIGHI, S.; VINCENZI, F.; VARANI, K. Pharmacology of adenosine receptors: the state of the art. **Physiological reviews**, 98, n. 3, p. 1591-1625, 2018.

BOSCH-QUERALT, M.; FLEDRICH, R.; STASSART, R. M. Schwann cell functions in peripheral nerve development and repair. **Neurobiology of disease**, 176, p. 105952, 2023.

BURNSTOCK, G., 2006, **Purinergic signalling—an overview**. Wiley Online Library. 26-53.

CANTY, A. J.; JACKSON, J. S.; HUANG, L.; TRABALZA, A.; BASS, C.; LITTLE, G.; TORTORA, M.; KHAN, S.; DE PAOLA, V. In vivo imaging of injured cortical axons reveals a rapid onset form of Wallerian degeneration. **BMC biology**, 18, p. 1-17, 2020.

CAO, H.; LIU, T.; CHEW, S. Y. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. **Advanced drug delivery reviews**, 61, n. 12, p. 1055-1064, 2009.

CARDOSO, F. S. D. S.; CARDOSO, R.; RAMALHO, B. D. S.; TABOADA, T. B.; NOGUEIRA, A. C. D. S.; MARTINEZ, A. M. B.; ALMEIDA, F. M. D. Inosine accelerates the regeneration and anticipates the functional recovery after sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, 423, 2019.

CARDOSO, F. S. D. S.; MARTINEZ, A. M. B.; ALMEIDA, F. M. D. Inosine: a novel treatment for sciatic nerve injury. **Neural Regeneration Research**, 16, n. 1, p. 127-128, 2021.

CARDOSO, R.; CARDOSO, F. S. D. S.; RAMALHO, B. D. S.; MARIA, G. D. S.; CAVALCANTI, R. R.; TABOADA, T. B.; ALMEIDA, J. S. D.; MARTINEZ, A. M. B.; ALMEIDA, F. M. D. Inosine Improves Functional Recovery and Cell Morphology Following Compressive Spinal Cord Injury in Mice. **Neurotrauma Reports**, 5, n. 1, p. 957-968, 2024/05/01 2024.

CHANG, B.; QUAN, Q.; LU, S.; WANG, Y.; PENG, J. Molecular mechanisms in the initiation phase of Wallerian degeneration. **European Journal of Neuroscience**, 44, n. 4, p. 2040-2048, 2016.

CHEN, P.; GOLDBERG, D. E.; KOLB, B.; LANSER, M.; BENOWITZ, L. I. Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99, n. 13, p. 9031-9036, 2002.

CHEN, P.; PIAO, X.; BONALDO, P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. **Acta neuropathologica**, 130, p. 605-618, 2015.

CHEN, Z.-L.; YU, W.-M.; STRICKLAND, S. Peripheral regeneration. **Annu. Rev. Neurosci.**, 30, p. 209-233, 2007.

CHENG, X.-T.; HUANG, N.; SHENG, Z.-H. Programming axonal mitochondrial maintenance and bioenergetics in neurodegeneration and regeneration. **Neuron**, 110, n. 12, p. 1899-1923, 2022.

CHIONO, V.; TONDA-TURO, C. Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering. **Progress in neurobiology**, 131, p. 87-104, 2015.

CHOMIAK, T.; HU, B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. **PloS one**, 4, n. 11, 2009.

CONFORTI, L.; GILLEY, J.; COLEMAN, M. P. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, 15, n. 6, p. 394-409, 2014.

CZECH, V. L.; O'CONNOR, L. C.; PHILIPPON, B.; NORMAN, E.; BYRNE, A. B. TIR-1/SARM1 inhibits axon regeneration and promotes axon degeneration. **Elife**, 12, p. e80856, 2023.

DACHIR, S.; SHABASHOV, D.; TREMBOVLER, V.; ALEXANDROVICH, A. G.; BENOWITZ, L. I.; SHOHAMI, E. Inosine improves functional recovery after experimental traumatic brain injury. **Brain research**, 1555, p. 78-88, 2014.

DALAMAGKAS, K.; TSINTOU, M.; SEIFALIAN, A. Advances in peripheral nervous system regenerative therapeutic strategies: a biomaterials approach. **Materials Science and Engineering: C**, 65, p. 425-432, 2016.

DEUMENS, R.; BOZKURT, A.; MEEK, M. F.; MARCUS, M. A.; JOOSTEN, E. A.; WEIS, J.; BROOK, G. A. Repairing injured peripheral nerves: bridging the gap. **Progress in neurobiology**, 92, n. 3, p. 245-276, 2010.

DIÓGENES, M. J.; RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. Adenosine A_{2A} Receptors and Neurotrophic Factors: Relevance for Parkinson's Disease. **The Adenosinergic System: A Non-Dopaminergic Target in Parkinson's Disease**, p. 57-79, 2015.

DOMINGUES, R. C. C.; PEREIRA, C. C.; BORGES, C. P. Morphological control and properties of poly (lactic acid) hollow fibers for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**, 134, n. 47, p. 45494, 2017.

DORON-MANDEL, E.; FAINZILBER, M.; TEREZIO, M. Growth control mechanisms in neuronal regeneration. **FEBS letters**, 589, n. 14, p. 1669-1677, 2015.

DURÇO, D. F.; PESTANA, F. M.; OLIVEIRA, J. T.; RAMALHO, B. D. S.; SOUZA, L. M.; CARDOSO, F. S.; DA SILVA, I. C.; MARQUES, S. A.; DOMINGUES, R. C.; PEREIRA, C. C. Grafts of human adipose-derived stem cells into a biodegradable poly (acid lactic) conduit enhances sciatic nerve regeneration. **Brain Research**, 1747, p. 147026, 2020.

EHLERS, M. D. Deconstructing the axon: Wallerian degeneration and the ubiquitin–proteasome system. **Trends in neurosciences**, 27, n. 1, p. 3-6, 2004.

FIELDS, R. D., 2006, **Nerve impulses regulate myelination through purinergic signalling**. Wiley Online Library. 148-161.

FLEDRICH, R.; KUNGL, T.; NAVE, K.-A.; STASSART, R. M. Axo-glial interdependence in peripheral nerve development. **Development**, 146, n. 21, p. dev151704, 2019.

FRATTINI, F.; PEREIRA LOPES, F. R.; ALMEIDA, F. M.; RODRIGUES, R. F.; BOLDRINI, L. C.; TOMAZ, M. A.; BAPTISTA, A. F.; MELO, P. A.; MARTINEZ, A. M. B. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit promote sciatic nerve regeneration and sensory neuron survival after nerve injury. **Tissue Engineering Part A**, 18, n. 19-20, p. 2030-2039, 2012.

GEDEN, M. J.; DESHMUKH, M. Axon degeneration: context defines distinct pathways. **Current opinion in neurobiology**, 39, p. 108-115, 2016.

GERDTS, J.; SUMMERS, D. W.; MILBRANDT, J.; DIANTONIO, A. Axon self-destruction: new links among SARM1, MAPKs, and NAD⁺ metabolism. **Neuron**, 89, n. 3, p. 449-460, 2016.

GILLEY, J.; COLEMAN, M. P. Endogenous Nmnat2 is an essential survival factor for maintenance of healthy axons. **PLoS biology**, 8, n. 1, p. e1000300, 2010.

GIROUARD, M. P.; BUENO, M.; JULIAN, V.; DRAKE, S.; BYRNE, A. B.; FOURNIER, A. E. The molecular interplay between axon degeneration and regeneration. **Developmental Neurobiology**, 78, n. 10, p. 978-990, 2018.

GOMEZ-SANCHEZ, J. A.; CARTY, L.; IRUARRIZAGA-LEJARRETA, M.; PALOMO-IRIGOYEN, M.; VARELA-REY, M.; GRIFFITH, M.; HANTKE, J.; MACIAS-CAMARA, N.; AZKARGORTA, M.; AURREKOETXEA, I. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. **Journal of Cell Biology**, 210, n. 1, p. 153-168, 2015.

GOMEZ-SANCHEZ, J. A.; PILCH, K. S.; VAN DER LANS, M.; FAZAL, S. V.; BENITO, C.; WAGSTAFF, L. J.; MIRSKY, R.; JESSEN, K. R. After nerve injury, lineage tracing shows that myelin and Remak Schwann cells elongate extensively and branch to form repair Schwann cells, which shorten radically on remyelination. **Journal of Neuroscience**, 37, n. 37, p. 9086-9099, 2017.

GORDON, T. Nerve regeneration: understanding biology and its influence on return of function after nerve transfers. **Hand Clinics**, 32, n. 2, p. 103-117, 2016.

GOULART, C. O.; JÜRGENSEN, S.; SOUTO, A.; OLIVEIRA, J. T.; DE LIMA, S.; TONDA-TURO, C.; MARQUES, S. A.; DE ALMEIDA, F. M.; MARTINEZ, A. M. B. A combination of Schwann-cell grafts and aerobic exercise enhances sciatic nerve regeneration. **PloS one**, 9, n. 10, p. e110090, 2014.

GOULART, C. O.; LOPES, F. R. P.; MONTE, Z. O.; DANTAS JR, S. V.; SOUTO, A.; OLIVEIRA, J. T.; ALMEIDA, F. M.; TONDA-TURO, C.; PEREIRA, C. C.; BORGES, C. P. Evaluation of biodegradable polymer conduits—poly (L-lactic acid)—for guiding sciatic nerve regeneration in mice. **Methods**, 99, p. 28-36, 2016.

HOUSHYAR, S.; BHATTACHARYYA, A.; SHANKS, R. Peripheral nerve conduit: materials and structures. **ACS chemical neuroscience**, 10, n. 8, p. 3349-3365, 2019.

INSERRA, M. M.; BLOCH, D. A.; TERRIS, D. J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery**, 18, n. 2, p. 119-124, 1998.

IRISARRI, C. History of peripheral nerve injuries. **Journal of Hand Surgery (European Volume)**, p. 17531934231198455, 2023.

IRWIN, N.; LI, Y.-M.; O'TOOLE, J.; BENOWITZ, L. Mst3b, a purine-sensitive Ste20-like protein kinase, regulates axon outgrowth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, n. 48, p. 18320-18325, 2006.

JANG, S. Y.; SHIN, Y. K.; PARK, S. Y.; PARK, J. Y.; LEE, H. J.; YOO, Y. H.; KIM, J. K.; PARK, H. T. Autophagic myelin destruction by Schwann cells during Wallerian degeneration and segmental demyelination. **Glia**, 64, n. 5, p. 730-742, 2016.

JESSEN, K.; MIRSKY, R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. **The Journal of physiology**, 594, n. 13, p. 3521-3531, 2016.

JESSEN, K.; MIRSKY, R. The success and failure of the schwann cell response to nerve injury. *Front Cell Neurosci* 13: 33. 2019.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. The role of c-Jun and autocrine signaling loops in the control of repair Schwann cells and regeneration. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 15, p. 820216, 2022.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R.; LLOYD, A. C. Schwann cells: development and role in nerve repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 7, n. 7, p. a020487, 2015.

JUNG, J.; CAI, W.; LEE, H. K.; PELLEGATTA, M.; SHIN, Y. K.; JANG, S. Y.; SUH, D. J.; WRABETZ, L.; FELTRI, M. L.; PARK, H. T. Actin polymerization is essential for myelin sheath fragmentation during Wallerian degeneration. **Journal of Neuroscience**, 31, n. 6, p. 2009-2015, 2011.

JURKOWITZ, M. S.; LITSKY, M. L.; BROWNING, M. J.; HOHL, C. M. Adenosine, inosine, and guanosine protect glial cells during glucose deprivation and mitochondrial inhibition: correlation between protection and ATP preservation. **Journal of neurochemistry**, 71, n. 2, 1998.

KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T.; SIEGELBAUM, S.; HUDSPETH, A. **Princípios de neurociências-5**. AMGH Editora, 2014. 8580554063.

KERSCHENSTEINER, M.; SCHWAB, M. E.; LICHTMAN, J. W.; MISGELD, T. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. **Nature medicine**, 11, n. 5, p. 572-577, 2005.

KIDD, G. J.; OHNO, N.; TRAPP, B. D. Biology of Schwann cells. **Handbook of clinical neurology**, 115, p. 55-79, 2013.

KIM, D.; ZAI, L.; LIANG, P.; SCHAFFLING, C.; AHLBORN, D.; BENOWITZ, L. I. Inosine enhances axon sprouting and motor recovery after spinal cord injury. **PLoS One**, 8, n. 12, 2013.

KIM, H. A.; MINDOS, T.; PARKINSON, D. B. Plastic fantastic: Schwann cells and repair of the peripheral nervous system. **Stem cells translational medicine**, 2, n. 8, p. 553-557, 2013.

KITAHARA, A. K.; SUZUKI, Y.; QI, P.; NISHIMURA, Y.; SUZUKI, K.; KIYOTANI, T.; TAKIMOTO, Y.; NAKAMURA, T.; SHIMIZU, Y.; ENDO, K. Facial nerve repair using a collagen conduit in cats. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery**, 33, n. 2, p. 187-193, 1999.

KNÖFERLE, J.; KOCH, J. C.; OSTENDORF, T.; MICHEL, U.; PLANCHAMP, V.; VUTOVA, P.; TÖNGES, L.; STADELMANN, C.; BRÜCK, W.; BÄHR, M. Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107, n. 13, p. 6064-6069, 2010.

KURICOVA, M.; LEDECKY, V.; LIPTAK, T.; MADARI, A.; GRULOVA, I.; SLOVINSKA, L.; NAGYOVA, M.; CIZKOVA, D. Oral administration of inosine promotes recovery after experimental spinal cord injury in rat. **Neurological Sciences**, 35, 2014.

LI, L.; YOKOYAMA, H.; KABURAGI, H.; HIRAI, T.; TSUJI, K.; ENOMOTO, M.; WAKABAYASHI, Y.; OKAWA, A. Remnant neuromuscular junctions in denervated muscles contribute to functional recovery in delayed peripheral nerve repair. **Neural Regeneration Research**, 15, n. 4, p. 731-738, 2020.

LISEK, M.; TOMCZAK, J.; BOCZEK, T.; ZYLINSKA, L. Calcium-Associated Proteins in Neuroregeneration. **Biomolecules**, 14, n. 2, p. 183, 2024.

LIU, W.; CHAKKALAKAL, J. V. The composition, development, and regeneration of neuromuscular junctions. **Current topics in developmental biology**, 126, p. 99-124, 2018.

LOPES, F. R. P.; DE MOURA CAMPOS, L. C.; CORRÊA JR, J. D.; BALDUINO, A.; LORA, S.; LANGONE, F.; BOROJEVIC, R.; MARTINEZ, A. M. B. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. **Experimental neurology**, 198, n. 2, p. 457-468, 2006.

LORBER, B.; HOWE, M. L.; BENOWITZ, L. I.; IRWIN, N. Mst3b, an Ste20-like kinase, regulates axon regeneration in mature CNS and PNS pathways. **Nature neuroscience**, 12, n. 11, p. 1407-1414, 2009.

LORETO, A.; ANTONIOU, C.; MERLINI, E.; GILLEY, J.; COLEMAN, M. P. NMN: the NAD precursor at the intersection between axon degeneration and anti-ageing therapies. **Neuroscience Research**, 197, p. 18-24, 2023.

LUBIŃSKA, L. Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. **Brain research**, 130, n. 1, p. 47-63, 1977.

LUNN, E.; PERRY, V.; BROWN, M.; ROSEN, H.; GORDON, S. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. **European Journal of Neuroscience**, 1, n. 1, p. 27-33, 1989.

MA, M. Role of calpains in the injury-induced dysfunction and degeneration of the mammalian axon. **Neurobiology of disease**, 60, 2013.

MA, C. H. E.; OMURA, T.; COBOS, E. J.; LATRÉMOLIÈRE, A.; GHASEMLOU, N.; BRENNER, G. J.; VAN VEEN, E.; BARRETT, L.; SAWADA, T.; GAO, F. Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. **The Journal of clinical investigation**, 121, n. 11, 2011.

MANKAVI, F.; IBRAHIM, R.; WANG, H. Advances in biomimetic nerve guidance conduits for peripheral nerve regeneration. **Nanomaterials**, 13, n. 18, p. 2528, 2023.

MARTINEZ, A. M. B.; ALLODI, S.; UZIEL, D. **Neuroanatomia essencial**. Grupo Gen-LTC, 2014. 8527723956.

MARTINEZ, A. M. B.; CORREA, E. M.; ALLODI, S. **Neuro-histologia: Uma Abordagem Celular e Sistêmica**. Editora Rubio, 2014. 8564956411.

MIETTO, B. S.; JHELUM, P.; SCHULZ, K.; DAVID, S. Schwann cells provide iron to axonal mitochondria and its role in nerve regeneration. **Journal of Neuroscience**, 41, n. 34, p. 7300-7313, 2021.

MIETTO, B. S.; MOSTACADA, K.; MARTINEZ, A. M. B. Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses. **Mediators of inflammation**, 2015, 2015.

MILLER, B. R.; PRESS, C.; DANIELS, R. W.; SASAKI, Y.; MILBRANDT, J.; DIANTONIO, A. A dual leucine kinase–dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. **Nature neuroscience**, 12, n. 4, p. 387-389, 2009.

MOLDOVAN, M.; ALVAREZ, S.; KRARUP, C. Motor axon excitability during Wallerian degeneration. **Brain**, 132, n. 2, p. 511-523, 2009.

MORTIMER, D.; FOTHERGILL, T.; PUJIC, Z.; RICHARDS, L. J.; GOODHILL, G. J. Growth cone chemotaxis. **Trends in neurosciences**, 31, n. 2, p. 90-98, 2008.

MSHEIK, Z.; EL MASSRY, M.; ROVINI, A.; BILLET, F.; DESMOULIÈRE, A. The macrophage: a key player in the pathophysiology of peripheral neuropathies. **Journal of Neuroinflammation**, 19, n. 1, p. 97, 2022.

MUELLER, M.; LEONHARD, C.; WACKER, K.; RINGELSTEIN, E. B.; OKABE, M.; HICKEY, W. F.; KIEFER, R. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. **Laboratory investigation**, 83, n. 2, p. 175-185, 2003.

NAPOLI, I.; NOON, L. A.; RIBEIRO, S.; KERAI, A. P.; PARRINELLO, S.; ROSENBERG, L. H.; COLLINS, M. J.; HARRISINGH, M. C.; WHITE, I. J.; WOODHOO, A. A central role for the ERK-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo. **Neuron**, 73, n. 4, p. 729-742, 2012.

NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in neurobiology**, 82, n. 4, p. 163-201, 2007.

NAVE, K.-A.; SALZER, J. L. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. **Current opinion in neurobiology**, 16, n. 5, p. 492-500, 2006.

NOCERA, G.; JACOB, C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 77, p. 3977-3989, 2020.

OSTROM, K. F.; LAVIGNE, J. E.; BRUST, T. F.; SEIFERT, R.; DESSAUER, C. W.; WATTS, V. J.; OSTROM, R. S. Physiological roles of mammalian transmembrane adenylyl cyclase isoforms. **Physiological reviews**, 102, n. 2, p. 815-857, 2022.

PARK, H. T.; FELTRI, M. L. Rac1 GTPase controls myelination and demyelination. **Bioarchitecture**, 1, n. 3, p. 110-113, 2011.

PARKINSON, D. B.; BHASKARAN, A.; ARTHUR-FARRAJ, P.; NOON, L. A.; WOODHOO, A.; LLOYD, A. C.; FELTRI, M. L.; WRABETZ, L.; BEHRENS, A.; MIRSKY, R. c-Jun is a negative regulator of myelination. **The Journal of cell biology**, 181, n. 4, p. 625-637, 2008.

PERRY, V.; BROWN, M.; LUNN, E.; TREE, P.; GORDON, S. Evidence that very slow Wallerian degeneration in C57BL/Ola mice is an intrinsic property of the peripheral nerve. **European Journal of Neuroscience**, 2, n. 9, p. 802-808, 1990.

PESTANA, F. M.; DOMINGUES, R. C.; OLIVEIRA, J. T.; DURÇO, D. F.; GOULART, C. O.; MENDONÇA, H. R.; DOS SANTOS, A. C. R.; DE CAMPOS, N. T.; DA SILVA, B. T.; PEREIRA, C. C. Comparison of morphological and functional outcomes of mouse sciatic nerve repair with three biodegradable polymer conduits containing poly (lactic acid). **Neural regeneration research**, 13, n. 10, p. 1811-1819, 2018.

QIU, J.; XIONG, J.; JIANG, L.; WANG, X.; ZHANG, K.; YU, H. Molecular mechanisms involved in regulating protein activity and biological function of MST3. **Cell Division**, 18, n. 1, p. 8, 2023.

QUINTES, S.; GOEBBELS, S.; SAHER, G.; SCHWAB, M. H.; NAVE, K. A. Neuron-glia signaling and the protection of axon function by Schwann cells. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 15, n. 1, p. 10-16, 2010.

RIBEIRO, F. F.; XAPELLI, S.; MIRANDA-LOURENCO, C. TANQUEIRO, S. R.; FONSECA-GOMES, J.; DIOGENES, M. J.; RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. **Neuropharmacology**, 104, p. 226-242, 2016.

RICCIO, M.; MARCHESINI, A.; PUGLIESE, P.; DE FRANCESCO, F. Nerve repair and regeneration: Biological tubulization limits and future perspectives. **Journal of cellular physiology**, 234, n. 4, p. 3362-3375, 2019.

SALZER, J. L. Schwann cell myelination. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 7, n. 8, p. a020529, 2015.

SARDELLA-SILVA, G.; MIETTO, B. S.; RIBEIRO-RESENDE, V. T. Four seasons for Schwann cell biology, revisiting key periods: Development, homeostasis, repair, and aging. **Biomolecules**, 11, n. 12, p. 1887, 2021.

SCHRÖDER, J. M. Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. **Brain research**, 45, n. 1, p. 49-65, 1972.

SEBASTIAO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine receptors and the central nervous system. **Adenosine receptors in health and disease**, p. 471-534, 2009.

SEDDON, H. Surgical disorders of the peripheral nerves. *In: Surgical disorders of the peripheral nerves*, 1975. p. xiii, 336-xiii, 336.

SHAIKH, G.; CRONSTEIN, B. Signaling pathways involving adenosine A2A and A2B receptors in wound healing and fibrosis. **Purinergic signalling**, 12, p. 191-197, 2016.

SHEN, Z. L.; LASSNER, F.; BADER, A.; BECKER, M.; WALTER, G. F.; BERGER, A. Cellular activity of resident macrophages during Wallerian degeneration. **Microsurgery**, 20, n. 5, p. 255-261, 2000.

SINGH, V. K.; HAQ, A.; TIWARI, M.; SAXENA, A. K. Approach to management of nerve gaps in peripheral nerve injuries. **Injury**, 53, n. 4, p. 1308-1318, 2022.

SMITH, K.; BLAKEMORE, W.; MURRAY, J.; PATTERSON, R. Internodal myelin volume and axon surface area: A relationship determining myelin thickness? **Journal of the Neurological Sciences**, 55, n. 2, p. 231-246, 1982.

SMITH, T. P.; SAHOO, P. K.; KAR, A. N.; TWISS, J. L. Intra-axonal mechanisms driving axon regeneration. **Brain research**, 1740, p. 146864, 2020.

STEVENS, B.; ISHIBASHI, T.; CHEN, J.-F.; FIELDS, R. D. Adenosine: an activity-dependent axonal signal regulating MAP kinase and proliferation in developing Schwann cells. **Neuron glia biology**, 1, n. 1, p. 23-34, 2004.

STIRLING, D. P.; STYS, P. K. Mechanisms of axonal injury: internodal nanocomplexes and calcium deregulation. **Trends in molecular medicine**, 16, n. 4, p. 160-170, 2010.

STOLL, G.; GRIFFIN, J.; LI, C. Y.; TRAPP, B. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. **Journal of neurocytology**, 18, p. 671-683, 1989.

SULAIMAN, O. A.; GORDON, T. Effects of short-and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. **Glia**, 32, n. 3, p. 234-246, 2000.

SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain**, 74, n. 4, p. 491-516, 1951.

VARGAS, M. E.; WATANABE, J.; SINGH, S. J.; ROBINSON, W. H.; BARRES, B. A. Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107, n. 26, p. 11993-11998, 2010.

VIJAYAVENKATARAMAN, S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. **Acta biomaterialia**, 106, p. 54-69, 2020.

VILLEGAS, R.; MARTINEZ, N. W.; LILLO, J.; PIHAN, P.; HERNANDEZ, D.; TWISS, J. L. Calcium release from intra-axonal endoplasmic reticulum leads to axon degeneration through mitochondrial dysfunction. **Journal of Neuroscience**, 34, n. 21, p. 7179-7189, 2014.

WALLER, A. V. XX. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, n. 140, p. 423-429, 1850.

WANG, J. T.; MEDRESS, Z. A.; BARRES, B. A. Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. **Journal of Cell Biology**, 196, n. 1, p. 7-18, 2012.

WEIß, E. M.; GELDERMANN, M.; MARTINI, R.; KLEIN, D. Macrophages influence Schwann cell myelin autophagy after nerve injury and in a model of Charcot-Marie-Tooth disease. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 28, n. 3, p. 341-350, 2023.

WELIHINDA, A. A.; KAUR, M.; GREENE, K.; ZHAI, Y.; AMENTO, E. P. The adenosine metabolite inosine is a functional agonist of the adenosine A2A receptor with a unique signaling bias. **Cellular signalling**, 28, n. 6, p. 552-560, 2016.

WONG, K. M.; BABETTO, E.; BEIROWSKI, B. Axon degeneration: make the Schwann cell great again. **Neural regeneration research**, 12, n. 4, p. 518-524, 2017.

WU, G.; WEN, X.; KUANG, R.; LUI, K. W.; HE, B.; LI, G.; ZHU, Z. Roles of Macrophages and Their Interactions with Schwann Cells After Peripheral Nerve Injury. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 44, n. 1, p. 11, 2024.

YANG, D. P.; KIM, J.; SYED, N.; TUNG, Y.-J.; BHASKARAN, A.; MINDOS, T.; MIRSKY, R.; JESSEN, K. R.; MAUREL, P.; PARKINSON, D. B. p38 MAPK activation promotes denervated Schwann cell phenotype and functions as a negative regulator of Schwann cell differentiation and myelination. **Journal of Neuroscience**, 32, n. 21, p. 7158-7168, 2012.

YANG, J.; WU, Z.; RENIER, N.; SIMON, D. J.; URYU, K.; PARK, D. S.; GREER, P. A.; TOURNIER, C.; DAVIS, R. J.; TESSIER-LAVIGNE, M. Pathological axonal death through a MAPK cascade that triggers a local energy deficit. **Cell**, 160, n. 1, p. 161-176, 2015.

ZAI, L.; FERRARI, C.; DICE, C.; SUBBIAH, S.; HAVTON, L. A.; COPPOLA, G.; GESCHWIND, D.; IRWIN, N.; HUEBNER, E.; STRITTMATTER, S. M. Inosine augments the effects of a Nogo receptor blocker and of environmental enrichment to restore skilled forelimb use after stroke. **Journal of Neuroscience**, 31, n. 16, p. 5977-5988, 2011.

ZHANG, J.; SUN, J.; ZHENG, Q.; HU, X.; WANG, Z.; LIANG, Z.; LI, K.; SONG, J.; DING, T.; SHEN, X. Low-level laser therapy 810-nm up-regulates macrophage secretion of neurotrophic factors via PKA-CREB and promotes neuronal axon regeneration in vitro. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 24, n. 1, p. 476-487, 2020.

ZHANG, Y.; HU, H.; TIAN, T.; ZHANG, L.; ZHAO, D.; WU, Q.; CHANG, Y.; WANG, Q.; ZHOU, S.; FENG, G. Mst3b promotes spinal cord neuronal regeneration by promoting growth cone branching out in spinal cord injury rats. **Molecular Neurobiology**, 51, p. 1144-1157, 2015.

ZIGMOND, R. E.; ECHEVARRIA, F. D. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. **Progress in neurobiology**, 173, p. 102-121, 22015019.

ZOCHODNE, D. W. Neurobiology of peripheral nerve regeneration. **Ed.: Cambridge University Press, New York**, 2008.