



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

**EFEITOS DO EXERCÍCIO E INOSINA APÓS LESÃO E REPARO DO NERVO
ISQUIÁTICO DE CAMUNDONGOS**

Tiago Bastos Taboada

Rio de Janeiro
Agosto/2024



Tiago Bastos Taboada

**EFEITOS DO EXERCÍCIO E INOSINA APÓS LESÃO E REPARO DO NERVO
ISQUIÁTICO DE CAMUNDONGOS**

Dissertação 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 Mestre.

Orientadora: Fernanda Martins de Almeida Maia

Rio de Janeiro
Agosto/2024

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

T511e Bastos Taboada, Tiago
EFEITOS DO EXERCÍCIO E INOSINA APÓS LESÃO E
REPARO DO NERVO ISQUIÁTICO DE CAMUNDONGOS / Tiago
Bastos Taboada. -- Rio de Janeiro, 2024.
77 f.

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

1. Lesões do Nervo Periférico. 2. Inosina. 3.
Exercício. 4. Tubulização. 5. Regeneração do Nervo. I.
Martins de Almeida Maia, Fernanda, orient. II.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tiago Bastos Taboada

EFEITOS DO EXERCÍCIO E INOSINA APÓS LESÃO E REPARO DO NERVO ISQUIÁTICO DE CAMUNDONGOS

Dissertação 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 Mestre.

Aprovada em: _____

(Dra. Fernanda Martins de Almeida Maia, doutora, UFRJ)

(Dr. Marcos Fabio Henriques dos Santos, doutor, UFRJ)

(Dr. Henrique Rocha Mendonça, doutor, UFRJ)

(Dr. Bruno de Siqueira Mietto, doutor, UFJF)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por colocar pessoas incríveis e inspiradoras ao meu lado em cada momento da minha jornada. Nada seria possível sem Ele e sem os meus. Obrigado pela família, pelos amigos e por cada um que cruzou meu caminho até aqui.

À minha esposa, melhor amiga e companheira de vida, Heloisa Faria, que acreditou em mim antes que eu mesmo pudesse sonhar em acreditar. Você sempre foi minha inspiração. Se eu tive forças para chegar até aqui, foi por você ser meu alicerce e me erguer em todos os momentos. Nós sabemos como é difícil adiar e abdicar de vários objetivos e sonhos para arriscar e tentar viver outros. Nem sempre são escolhas fáceis, nem sempre sabemos se são as certas, mas sempre escolhemos juntos e nos apoiamos até o fim. Cada conquista da vida dedico a você. Você me incentiva a buscar sonhos maiores, é meu exemplo de cuidado, dedicação, sabedoria e humildade. Juntos seguimos crescendo, buscando novos objetivos e realizando nossos sonhos. Seremos sempre uma unidade perfeita.

Aos meus pais, Dionysio Taboada e Carla Taboada, por me possibilitarem a vida, por serem exemplo de amor e companheirismo, por me ensinarem que o amor supera todos os obstáculos. Por sempre colocarem meus sonhos à frente dos seus. Vocês sempre se dedicaram, batalharam e trabalharam sem descanso para me proporcionar uma vida tranquila e uma educação de qualidade. Hoje concluo mais esse ciclo graças à dedicação e amor de vocês.

Ao meu irmão, Diogo Taboada, por ser meu melhor amigo e me proteger desde o início da vida. Dividimos todos os momentos, comemoramos os bons e nos apoiamos nos ruins. Que possamos seguir assim, vivendo bons momentos e sabendo que teremos um ao outro em cada um deles. À minha cunhada Nicole Saidler, que atura e cuida do meu irmão.

Aos meus sogros, Edinaldo Oliveira e Mariangela Oliveira, vocês que me receberam em sua família e cuidaram de mim como um filho. Me apoiaram em momentos difíceis e me proporcionaram momentos incríveis. Deram a vida à pessoa mais importante da minha vida, por isso nunca serei capaz de retribuir. Ao meu cunhado, Victor Oliveira, por me receber na família como um irmão. Aos meus tios, Luizmar Junior, Claudia Queiroz, Lilian Leite e Paulo Reis e aos meus primos, Ana Claudia Faria e Luiz Felipe Faria, por me receberem na sua família e lares como um verdadeiro membro. À Jade que chegou a pouco tempo e já trouxe tanto amor para nossa família.

Aos meus avós Hélio Bastos (*in memoriam*) e Velusia Bastos, por serem meus grandes exemplos, por mostrarem que o amor transcende. Vocês foram a base da minha educação e caráter. Aos meus avós Dionysio Taboada (*in memoriam*) e Ludya Taboada (*in memoriam*), por me mostrarem que o simples da vida é suficiente para se viver bem e feliz, basta ter amor. Aos meus familiares por entenderem os momentos de ausência.

À Milka, que chegou em um momento tão difícil da humanidade e com toda sua delicadeza e força foi a melhor amiga que uma pessoa poderia ter. Nos momentos de isolamento foi presença. As apresentações sempre têm sua marca registrada. Hoje nossa família só é completa com você. À Shakira (*in memoriam*), Lindinha (*in memoriam*), Tony e Panco, só quem vive esse amor sabe o quão puro e sincero ele é. Vocês são e foram a alegria da casa, nenhuma chegada ou partida foi a mesma depois que vocês chegaram.

Aos meus amigos, Cleysson Costa, Juliana Almeida e Hulhi Anne Martins, por estarem comigo desde a graduação em Fisioterapia até aqui, já são sete anos de

amizade e cuidado. Passamos por muitas coisas nesse tempo, dividimos às salas de aula, de simpósios, de estágio, de trabalho e de casa. Parceria de irmãos e de milhões. Se eu pudesse escolher, não teria escolhido pessoas melhores. Que tenhamos mais muitos anos de parceria.

À minha amiga, Luíza Heringer, essa dissertação não teria saído se não fosse pela sua disposição em ajudar ao próximo, muitas vezes deixando em segundo plano suas prioridades para ajudar aos outros. Cada experimento contou com sua ajuda e orientação. Os experimentos perdidos que foram salvos e os que deram certo tiveram sua contribuição.

À minha orientadora, Fernanda Almeida, por ter aberto as portas da pesquisa para um aluno do 2º período, por ter acreditado que chegaríamos até aqui, quase sete anos depois, ao final de uma dissertação de mestrado e por confiar que chegaremos ainda mais longe. Por saber conduzir os momentos de orientação e desorientação sem precisar de sermões. A vida de orientador e aluno é cheia de altos e baixos, mas que bom que vivemos mais altos do que baixos e soubemos aproveitar o melhor de cada momento. Agradeço pela parceria e pelas oportunidades.

À Prof.^a Ana Maria Martinez, por abrir as portas do Laboratório de Neurodegeneração e Reparo, para que diversos sonhos pudessem ser sonhados e realizados. Sua dedicação e amor pela pesquisa e ciência são inspiradores. Agradeço por cada ensinamento, pela disponibilidade de ouvir e ensinar. Fazer pesquisa ao seu lado é motivo de muito orgulho.

Às minhas amigas, Greice Nascimento e Viviane Souza, por dividirem momentos únicos, me possibilitaram evoluir como pessoa e amigo, se apoiar nas horas mais difíceis e entender os momentos mais complexos pelos quais passamos não é para qualquer um, vivemos e sobrevivemos a eles.

À minha amiga, Roberta Cavalcante, agradeço pelas boas risadas, pela parceria nas aulas aleatórias da pós, seguiremos nos divertindo no meio do caos do doutorado.

Aos meus amigos Gabriel Valadares e Camila Linhares, não poderia ter alunos melhores me acompanhando, obrigado por me ajudarem e me salvarem diversas vezes ao longo dessa caminhada, alunos dos quais me orgulho e tenho o prazer de chamar de amigos.

Aos meus amigos, Pedro Silva e Bruno Javaroni, não tem como ficar sério com vocês no ambiente. Que bom que estão no laboratório. Agradeço pelas milhares de vezes que me ajudaram.

Aos professores do Laboratório de Neurodegeneração e Reparo, Henrique Mendonça e Suelen Marques, agradeço pelos ensinamentos e pelas contribuições ao longo destes anos de laboratório.

Aos demais amigos de laboratório, aos que ainda estão lá e aqueles que já passaram, Fellipe Cardoso, Ricardo Cardoso, Bruna Ramalho, Caio Prins, Anne Carol Rodrigues, Anna Toledo, Laura Savoidi, Givanildes Assis, Emanuela Ribeiro, Julia Rios, Ana Milena Silva, Fernanda Pestana, Guilherme Santos, João Brocolo, Alex Gomes, Tais Martins, Barbara Lomônaco, Bryan Hudson, Jorge Luis, Julia Oliveira e Camila Goulart. Agradeço pelos ensinamentos diários e por tornarem mais leve o dia-a-dia no laboratório.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, agradeço por mais essa etapa concluída.

RESUMO

TABOADA, Tiago B. **EFEITOS DO EXERCÍCIO E INOSINA APÓS LESÃO E REPARO DO NERVO ISQUIÁTICO DE CAMUNDONGOS**. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM MEDICINA - ANATOMIA PATOLÓGICA), FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO, 2024.

As Lesões do Nervo Periférico (LNP) representam uma significativa fonte global de incapacidade, manifestando-se através de comprometimento sensório-motor que resulta em impactos negativos na funcionalidade e, frequentemente, leva ao afastamento das atividades laborais. Essas lesões podem ter origem traumática e não-traumática, sendo as mais graves de difícil resolução. Ainda que as abordagens terapêuticas utilizadas para acelerar a regeneração e recuperar as funções do nervo periférico sejam amplamente conhecidas, restabelecer a funcionalidade prévia à lesão tem se mostrado um grande desafio na prática clínica. Por isso, diversas modalidades terapêuticas vêm sendo estudadas de forma isolada ou associadas. Neste trabalho, escolhemos algumas estratégias que são amplamente estudadas em nosso grupo de pesquisa, como a tubulização, como modelo de reparo e, como estratégias de tratamento, a inosina e o exercício em esteira. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos do exercício em esteira e da inosina na regeneração do nervo isquiático, após lesão por transecção e tubulização em camundongos. Para isso, foram utilizados camundongos C57/Bl6, machos, com idades de 8-12 semanas, que tiveram seus nervos transecionados. Os cotos proximais e distais, foram suturados a uma órtese tubular de poli-ácido láctico, permitindo um intervalo de 3 cm. Os animais foram tratados, por via intraperitoneal, de acordo com a alocação, com solução salina ou inosina (70 mg/ml) 1 h após a lesão e, diariamente, ao longo da primeira semana. A partir da segunda semana até a oitava semana, iniciamos o protocolo de exercício, onde os animais foram colocados em uma esteira motorizada a uma velocidade 6-12m/min, por 10 min, três vezes por semana. Previamente à lesão e, semanalmente, ao longo das oito semanas de sobrevida, os animais foram analisados através de testes funcionais (n=4). Para avaliar a funcionalidade motora, foi utilizado o Índice de Função do Isquiático (IFI), para a sensitiva, o teste da picada do alfinete e teste da pressão crescente da pata. Ao final da sobrevida, foi realizada a eletrofisiologia, em seguida os animais foram perfundidos com paraformaldeído e os tecidos foram coletados para análises morfológicas qualitativas e quantitativas (n=3). Nossos

resultados mostram que o tratamento com inosina combinado ao exercício em esteira melhora a recuperação funcional com melhores pontuações no IFI a partir da 6ª semana, no teste da picada do alfinete ao final da sobrevida e uma resposta a menores estímulos no teste da pressão crescente da pata a partir da 4ª semana. Além disso, promove a regeneração do nervo isquiático após transecção e reparo apresentando um maior número total de fibras mielínicas e dentro da faixa preconizada como ideal, maiores áreas da fibra, axônio e mielina, aumenta a área imunomarcada para NF200 e A2Ar. previne a morte neuronal no corno anterior da medula espinal e nos gânglios da raiz dorsal, além de atenuar a perda ponderal e a hipotrofia do músculo gastrocnêmio. Assim, nossos resultados demonstram que a associação de inosina e exercício em esteira pode ser uma alternativa importante na recuperação de lesões do nervo periférico.

ABSTRACT

TABOADA, Tiago B. **EFFECTS OF EXERCISE AND INOSINE AFTER LESION AND REPAIR OF THE SCIATIC NERVE IN MICE.** DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM MEDICINA - ANATOMIA PATOLÓGICA), FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO, 2024.

Peripheral Nerve Injuries represent a significant global source of disability, characterized by sensorimotor impairment leading to negative impacts on functionality and often resulting in work disability. These injuries can have traumatic or non-traumatic origins, with the most severe ones being difficult to resolve. Despite the well-known therapeutic approaches to accelerate peripheral nerve regeneration and restore function, achieving pre-injury functionality remains a major challenge in clinical practice. Therefore, various therapeutic modalities are being studied either in isolation or combination. In this study, we selected some strategies widely investigated in our research group, such as tubulization as a repair model, and inosine and treadmill exercise as treatment strategies. The aim of this study is to evaluate the effects of treadmill exercise and inosine on sciatic nerve regeneration following transection injury and tubulization in mice. Male C57/Bl6 mice aged 8-12 weeks had their nerves transected, and the proximal and distal stumps were sutured to a Polylactic Acid tubular orthosis, allowing a 3 cm gap. Animals were treated with either saline or inosine (70 mg/ml) 1 h post-injury and daily throughout the first week. From the second to the eighth week, the exercise protocol started, with animals placed on a motorized treadmill at a speed of 6-12 m/min for 10 min, three times a week. Prior to injury and weekly over the eight-week survival period, animals were assessed using functional tests (n=4): the Sciatic Functional Index (SFI) for motor function, the pinprick test for sensory function, and the paw pressure test for increasing pressure. At the end of the survival period, electrophysiology was conducted, then the animals were perfused with paraformaldehyde and tissues were collected for qualitative and quantitative morphological analyses (n=3). Results demonstrate that treatment with inosine combined with treadmill exercise improves functional recovery, with better SFI scores from the 6th week, improved response in the pinprick test at the end of the survival period, and response to lower stimuli in the increasing paw pressure test from the 4th week. Additionally, it promotes sciatic nerve regeneration following transection and repair, exhibiting a higher number of total myelinated fibers within the ideal range, larger fiber, axon, and myelin areas, increases the area immunostained for NF200 and

A2Ar, prevents neuronal death in the anterior horn of the spinal cord and in the dorsal root ganglia, and attenuates weight loss and gastrocnemius muscle hypotrophy. These findings demonstrate that the combination of inosine and treadmill exercise could be a significant alternative in the recovery of peripheral nerve injuries.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. O SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO.....	16
1.2. LESÃO DO NERVO PERIFÉRICO	21
1.2.1. Classificação das Lesões do Nervo Periférico	21
1.2.2. Degeneração Walleriana	22
1.3. RESPOSTAS À LESÃO DO NERVO PERIFÉRICO.....	25
1.4. ESTRATÉGIAS DE REPARO.....	25
1.4.1. Tubulização	26
1.4.2. Inosina	27
1.4.3. Exercício	29
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVO GERAL	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. ANIMAIS E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	31
3.2. PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DOS TRATAMENTOS	32
3.2.1. Inosina	32
3.2.2. Protocolo de exercício físico	32
3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS	33
3.4. DESENHO EXPERIMENTAL	33
3.5. TESTES FUNCIONAIS.....	34
3.5.1. Índice de função do isquiático	34
3.5.2. Teste da picada do alfinete (Pin Prick Test)	35
3.5.3. Teste de pressão crescente na pata (Analgesímetro digital - Von Frey eletrônico)	35
3.5.4. Eletroneuromiografia	36
3.6. PERFUSÃO E OBTENÇÃO DOS TECIDOS	37
3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	38
3.8. PREPARO DO MATERIAL PARA CORTES SEMIFINOS E ULTRAFINOS E ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	38
3.9. MICROSCOPIA ÓPTICA (MO).....	40
3.10. IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ).....	40
3.11. QUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS SENSITIVOS DOS GRD E DOS MOTONEURÔNIOS DA MEDULA ESPINAL.....	42
3.12. ANÁLISE DOS MÚSCULOS GASTROCNÊMIOS.....	42
3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43

4.	RESULTADOS	43
4.1.	ÍNDICE DE FUNÇÃO DO ISQUIÁTICO.....	43
4.2.	TESTE DA PICADA DO ALFINETE (PIN PRICK TEST)	46
4.3.	TESTE DE PRESSÃO CRESCENTE NA PATA (ANALGESÍMETRO DIGITAL- VON FREY ELETRÔNICO).....	46
4.4.	ELETROFISIOLOGIA	48
4.5.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	49
4.6.	MORFOLOGIA E MORFOMETRIA	51
4.7.	ANÁLISE DE NEUROFILAMENTOS E RECEPTORES PURINÉRGICOS	56
4.8.	QUANTIFICAÇÃO DE CORPOS CELULARES DE MOTONEURÔNIOS E NEURÔNIOS SENSÍTIOS	57
4.9.	ANÁLISE DOS MÚSCULOS GASTROCNÊMIOS	59
5.	DISCUSSÃO	63
6.	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	71

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
AMPK - do inglês “*Activated Protein Kinase*”
ATP - do inglês “*Adenosine Triphosphate*”
BDNF - do inglês “*Brain Derived Neurotrophic Factor*”
CS - Células de Schwann
DW - Degeneração Walleriana
GAP-43 - do inglês “*Growth Associated Protein-43*”
HMDS - Hexametildissilazano
HE - Hematoxilina e Eosina
LD - Latência Distal
LNPs - Lesões do Nervo Periférico
LP - Latência Proximal
IFI - Índice de Função do Isquiático
IHQ - Imunohistoquímica
IL-1 - do inglês “*Interleukin 1*”
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MO - Microscopia Óptica
Mst3b - do inglês “*Mammalian sterile 20-like kinase-3b*”
NGF - do inglês “*Nerve Growth Factor*”
NGS - do inglês “*Normal Goat Serum*”
PAMC - Potencial de Ação Muscular Composto
PBS - do inglês “*Phosphate-Buffered Saline*”
PFA - Paraformaldeído
PL - do inglês “*Print Length*”
PLA - do inglês “*Polylactic Acid*”
SEM - do inglês “*Standard Error of the Mean*”
SNC - Sistema Nervoso Central
SNP - Sistema Nervoso Periférico
TNF- α - do inglês “*Tumor Necrosis Factor Alpha*”
TS - do inglês “*Toe Spread*”
VCN - Velocidade de Condução Nervosa

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais transições na linhagem do precursor da célula de Schwann (SCP).....	18
Figura 2. Desenhos tridimensionais esquemáticos mostrando a ultraestrutura de uma fibra mielínica e uma amielínica	19
Figura 3. Diagramas esquemáticos das estruturas da bainha de mielina.....	20
Figura 4. Ilustração esquemática da condução saltatória	21
Figura 5. Progressão da degeneração Walleriana e regeneração de axônios após LNP	24
Figura 6. Representação esquemática da degradação da inosina e seus mecanismos de ação	29
Figura 7. Desenho experimental. Representação gráfica dos materiais e métodos utilizados neste estudo.....	34
Figura 8. Representação do PAMC	37
Figura 9. Esquema ilustrativo dos três segmentos do nervo e seus respectivos processamentos	38
Figura 10. Esquema ilustrativo das 5 áreas quantificadas em cada amostra....	40
Figura 11. Índice de Função do Isquiático	45
Figura 12. Teste da Picada do Alfinete	46
Figura 13. Teste de Pressão Crescente na Pata	47
Figura 14. Eletrofisiologia.....	49
Figura 15. Microscopia Eletrônica de Varredura da órtese tubular de PLA	50
Figura 16. Microscopia Eletrônica de Varredura das órteses tubulares e os nervos em seu interior	51
Figura 17. Morfologia dos nervos em regeneração.....	52
Figura 18. Ultraestrutura dos nervos em regeneração. Cortes ultrafinos do segmento B dos nervos isquiáticos dos animais dos 4 grupos	53
Figura 19. Morfometria dos nervos em regeneração	55
Figura 20. Análise da área relativa imunomarcada para NF-200.....	56
Figura 21. Análise da área relativa imunomarcada para A2Ar	57
Figura 22. Quantificação de corpos celulares de motoneurônios e neurônios sensitivos.....	59
Figura 23. Análise dos músculos gastrocnêmios.	60
Figura 24. Análise morfológica dos músculos gastrocnêmios corados com HE	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela com a descrição dos 4 grupos utilizados e procedimentos aos quais foram submetidos.....	33
Tabela 2. Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados.....	41

1. INTRODUÇÃO

As lesões do nervo periférico (LNP) são a causa mais comum de lesões do sistema nervoso (HOUSHYAR; BHATTACHARYYA; SHANKS, 2019). As LNP representam uma significativa fonte global de incapacidade, manifestando-se através de comprometimento sensório-motor que resulta em impactos negativos na funcionalidade e, frequentemente, leva ao afastamento das atividades laborais (NAVARRO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2013; MODRAK et al., 2020; LAVORATO et al., 2023). Notavelmente, 59% dos casos ocorrem em pacientes com idades compreendidas entre 18 e 35 anos, sendo a média de idade registrada de 34,6 anos. Além disso, a incidência de LNPs é significativamente maior em homens do que em mulheres, com uma proporção aproximada de 5 para 1 (TAYLOR et al., 2008, NADI et al., 2018).

Os dados acerca da epidemiologia das LNP são escassos, dificultando evidenciar as demandas das populações envolvidas e a tomada de decisão embasada em estratégias que diminuam os riscos e impactos desta condição não só na qualidade de vida dos acometidos como também do sistema de saúde (RALPH N.A. MURPHY et al., 2023).

Estas lesões podem ter origem traumática ou não-traumática. No caso das lesões traumáticas, destacam-se causas como colisões envolvendo veículos motorizados, lesões penetrantes, lacerações, projéteis de arma de fogo, quedas, fraturas, lesões por tração e esmagamento. Por outro lado, as causas não-traumáticas abrangem neuropatias de compressão, neuropatia diabética, vasculopatias e infecções (CAMPBELL, 2008; OSBORNE, ANASTAKIS e DAVIS, 2018).

1.1. O SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO

O sistema nervoso periférico (SNP) tem como principal função transmitir a informação entre os centros superiores e os órgãos efetores (ROSS e PAWLINA, 2016; BEAR, 2017; SCHÜNKE et al., 2019), sendo formado pelos nervos cranianos e espinhais, responsáveis por conduzir os impulsos eferentes, que partem do sistema nervoso central (SNC) e aferentes que retornam para ele; pelos gânglios, que são agregados de corpos celulares neuronais fora do SNC; e por terminações nervosas especializadas. O SNP é formado por dois tipos celulares: o neurônio e as células da glia. O neurônio é considerado a unidade funcional do sistema nervoso, formado por um corpo celular (ou soma) onde estão presentes as organelas da célula e onde ocorre a síntese de proteínas; por prolongamentos denominados dendritos que

recebem estímulos de outros neurônios ou do ambiente; e os axônios, prolongamentos efetores que emitem estímulos do corpo celular para outras células. Já as células da glia, conhecidas como neuroglia periférica, são células de sustentação, que consistem em células de Schwann (CS), células da glia entérica e células satélites, importantes para o suporte físico, nutricional e para a funcionalidade dos neurônios. (LENT, 2010; ROSS e PAWLINA, 2016; BEAR, 2017; SCHÜNKE et al., 2019)

Quando se trata do SNP, o impulso nervoso percorre os nervos periféricos constituídos por axônios e CS, além de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. Os tecidos conjuntivos fornecem suporte estrutural e organização às estruturas que compõem o nervo. Eles também são responsáveis por envolver e proteger esses componentes contra danos mecânicos, além de facilitar a transmissão eficiente de impulsos nervosos ao longo do nervo. São divididos em três camadas, da mais interna para a mais externa observamos o endoneuro formado por tecido conjuntivo frouxo associado a cada fibra nervosa, o perineuro formado por tecido conjuntivo especializado que circunda o fascículo nervoso e o epineuro que consiste em tecido conjuntivo denso não modelado, circundando e unindo os fascículos nervosos em um único feixe. Cada porção possui suas características funcionais e morfológicas específicas (ROSS e PAWLINA, 2016; MODRAK et al., 2019; WANG, 2019).

Em geral, as fibras nervosas são constituídas por um axônio e seus envoltórios. Estes envoltórios são produzidos por células específicas, no caso do SNP, pelas CS. Os precursores das CS são as células gliais dos primeiros nervos embrionários. Eles são gerados a partir da crista neural e, por sua vez, geram CS imaturas (JESSEN, MIRSKY E LLOYD, 2015). A partir desse momento, as CSs podem se diferenciar em dois fenótipos principais, um mielinizante e um não mielinizante (Remak) e, em casos de lesão, as CSs ainda podem se desdiferenciar em um fenótipo de reparo (Bünger) conforme podemos observar na Figura 1. Os axônios de menor calibre são normalmente envoltos pelas CS não mielinizantes, no entanto, elas se associam com mais de um axônio, constituindo as fibras amielínicas (Figura 2, A). Em contrapartida, nas fibras mielínicas (Figura 2, B), axônios de maior calibre serão envoltos pelas CS mielinizantes, que se organizam formando um invólucro lamelar concêntrico denominado bainha de mielina, basicamente constituída por lipídios, resultando em um envoltório altamente isolante para permitir a condução saltatória. (JESSEN e MIRSKY, 2005; LENT, 2010; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

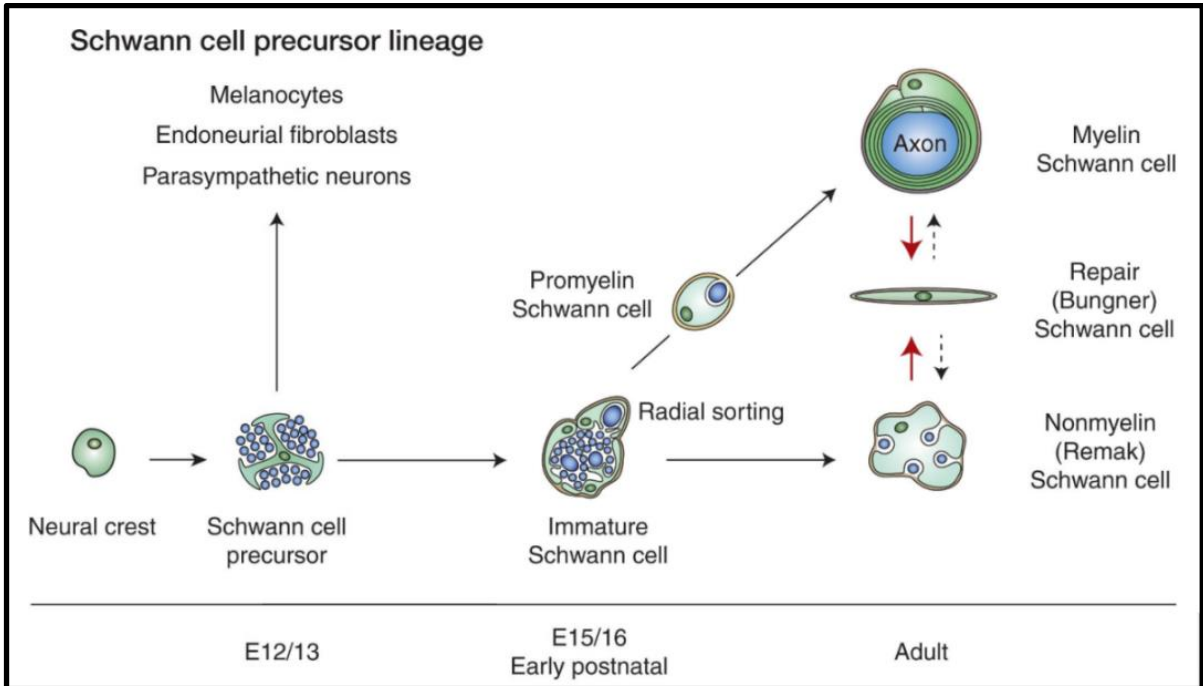


Figura 1. Principais transições na linhagem do precursor da célula de Schwann (SCP). O diagrama mostra as transições de desenvolvimento e induzidas por lesão. Setas pretas ininterruptas, desenvolvimento normal; setas vermelhas, a resposta à lesão das CS; setas pontilhadas, dediferenciação das células de Büngner em células mielínicas e Remak pós-reparo. As datas embrionárias (E) referem-se ao desenvolvimento do camundongo. (Modificado de Jessen e Mirsky, 2012). Disponível em: JESSEN, MIRSKY e LLOYD, 2015.

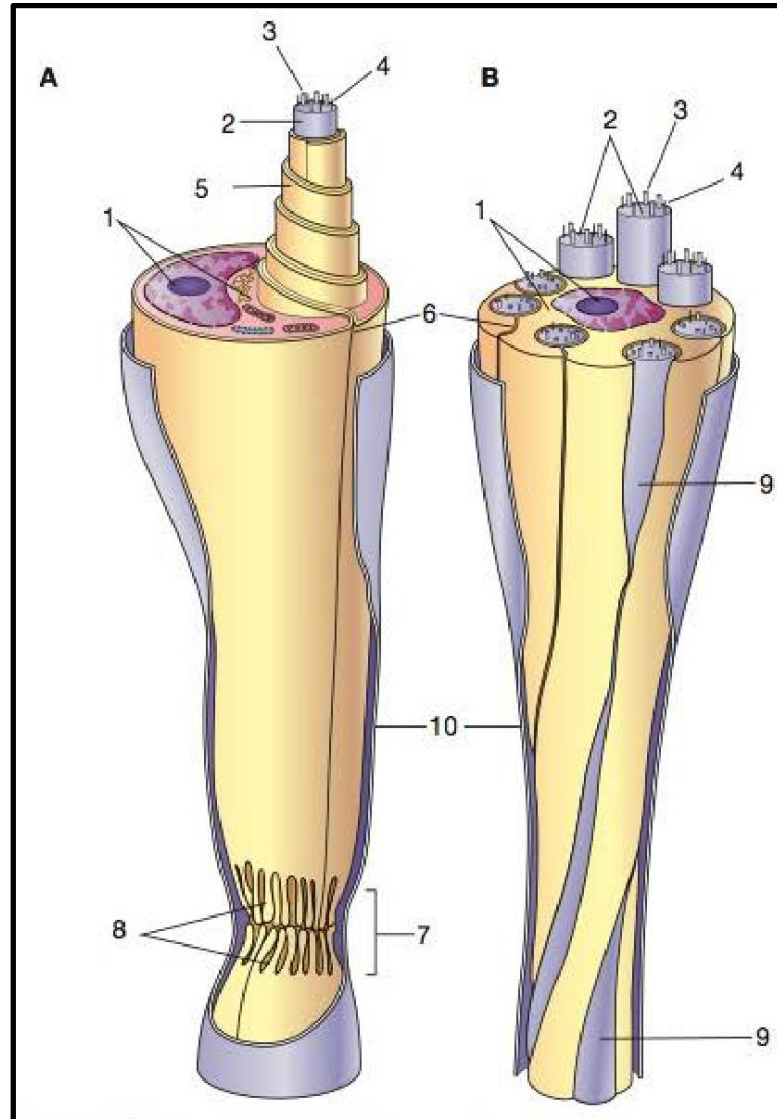


Figura 2. Desenhos tridimensionais esquemáticos mostrando a ultraestrutura de uma fibra mielínica (A) e uma amielínica (B). 1. Núcleo e citoplasma de célula de Schwann; 2. axônio; 3. microtúbulos; 4. neurofilamentos; 5. bainha de mielina; 6. mesaxônio; 7. nodo de Ranvier; 8. interdigitação dos prolongamentos das CS no nodo de Ranvier; 9. vista lateral de um axônio amielínico; 10. lâmina basal. Adaptada de Krsti (RV: Ultra structure of the Mammalian Cell. Springer-Verlag, 1979). Disponível em: JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017.

No SNP a bainha de mielina é formada a partir da sobreposição de camadas lipoproteicas, estabelecidas pelo citoplasma das CS, que envolvem o axônio de forma não contínua, ou seja, uma região axonal é coberta por ela, enquanto outra fica desnuda, com exposição do axolema (Figura 3). Esta região desprovida de mielina é rica em canais de sódio dependentes de voltagem e é denominada nodo de Ranvier, enquanto a região delimitada por dois nodos de Ranvier consecutivos (área recoberta pela mielina) é chamada de internodo. Ademais, é possível observar que as alças terminais de mielina fazem contato direto com a membrana do axônio, numa região conhecida como paranodo, onde a membrana interna da CS e do axolema subjacente entram em contato. Esta organização permite que o 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 como observado na figura 4 (KANDEL, 2014; MARTINEZ et al., 2014).

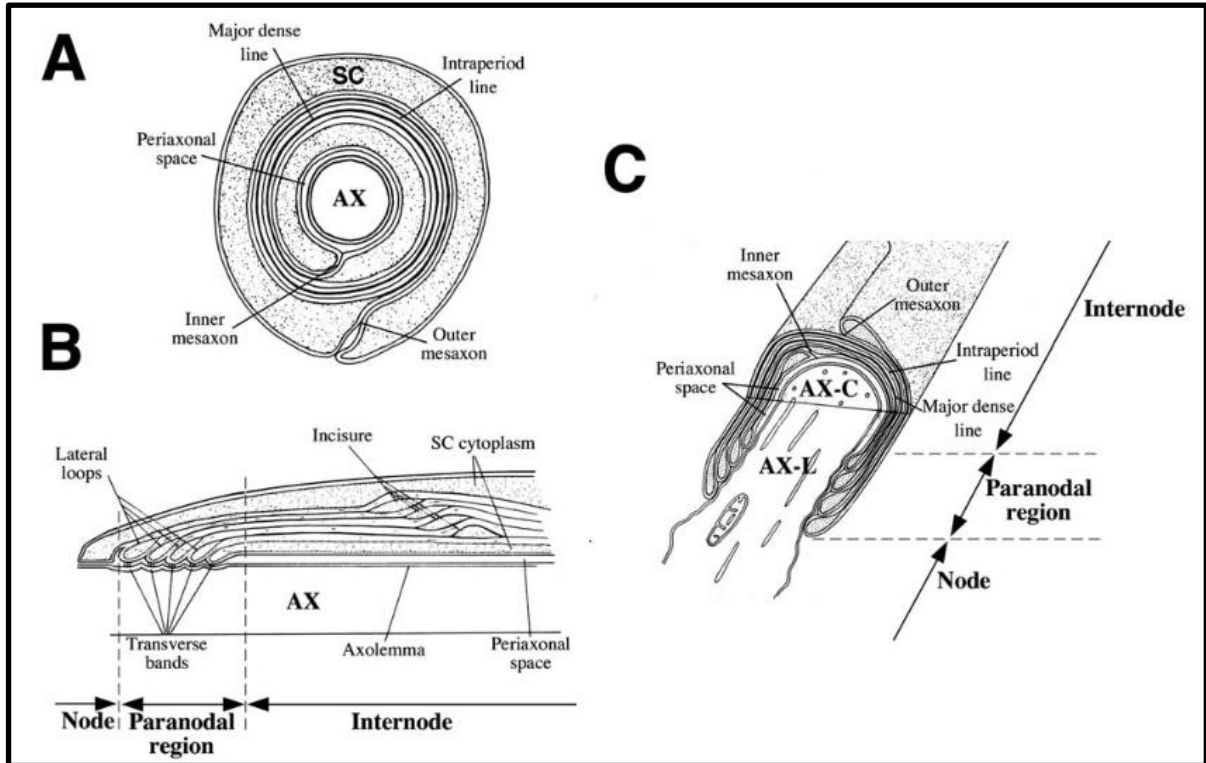


Figura 3. Diagramas esquemáticos das estruturas da bainha de mielina. Esses diagramas mostram apenas algumas camadas de mielina compacta para simplificação. **A.** No SNP, a SC envolve o axônio e o mesaxônio, onde a membrana plasmática da SC entra em contato consigo mesma, é espiralada em lamelas concêntricas em torno do axônio e firmemente disposta para formar a mielina compacta. **B.** Perspectiva longitudinal de um axônio mielinizado no SNP. No final de cada segmento de mielina compacta (internodo) está um nodo de Ranvier, que não é coberto por mielina. Entre o nodo e o internodo está a região paranodal com estruturas altamente especializadas. As alças laterais e as incisuras de Schmidt-Lantermann são regiões contendo citoplasma da SC onde as membranas não estão compactadas. **C.** Axônio mielinizado é mostrado parcialmente em secção transversal (AX-C) e parcialmente longitudinal (AX-L). Adaptado de QUARLES, 2002.

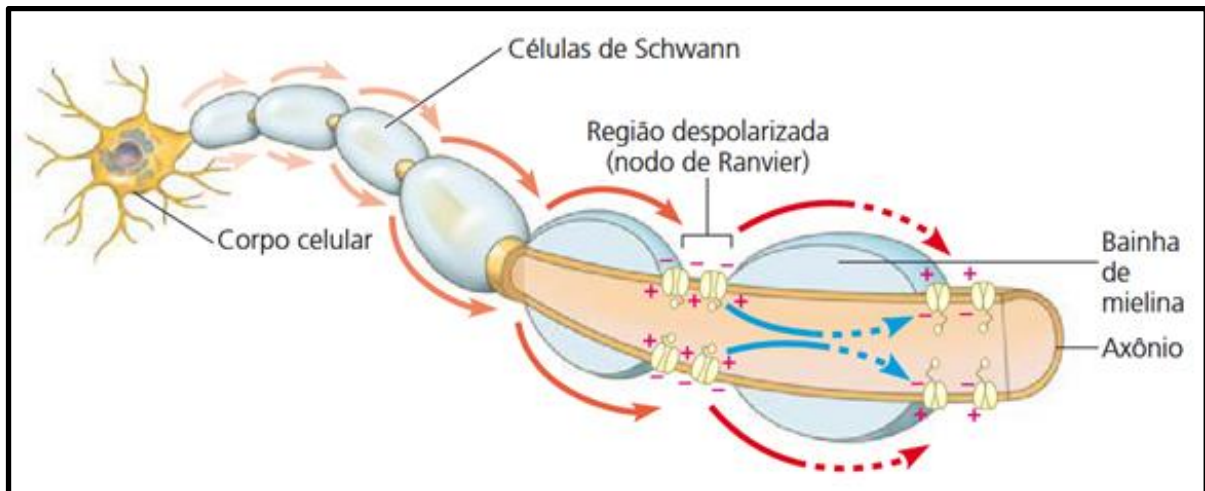


Figura 4. Ilustração esquemática da condução saltatória. Em um axônio mielinizado, a despolarização ocorre durante um potencial de ação de um nodo de Ranvier e espalha-se ao longo do interior do axônio até o próximo nodo (setas azuis), onde os canais de sódio voltagem-dependentes permitem que se reiniciem. Dessa forma, o potencial de ação parece saltar de nodo em nodo à medida que viaja ao longo do axônio (setas vermelhas). Adaptada de: REECE et al., 2014.

1.2. LESÃO DO NERVO PERIFÉRICO

Quando a continuidade da estrutura do nervo é comprometida há a interrupção da propagação do impulso nervoso que acarreta em déficits das atividades motoras, sensitivas e autonômicas, caracterizando a lesão do nervo periférico. A gravidade das lesões dos nervos periféricos é classificada dependendo da ocorrência de desmielinização e da extensão do dano axonal e do tecido conjuntivo (CHOI et al., 2016; BILLET et al., 2019; NOCERA e JACOB, 2020).

1.2.1. Classificação das Lesões do Nervo Periférico

Em 1942, Seddon classificou as LNP em 3 níveis de severidade, definindo-os como: neurapraxia, lesões compressivas as quais têm resolução rápida dos sintomas; axonotmese, onde se observa uma perda na continuidade do axônio com preservação da continuidade do nervo; neurotmese, na qual ocorre secção completa da continuidade do nervo sem preservação de nenhuma de suas estruturas conjuntivas. Posteriormente, Sunderland (1951) redefine essa classificação em 5 graus, considerando além da gravidade da lesão as suas características histopatológicas, critérios eletrodiagnósticos e clínicos associados à capacidade regenerativa, considerando a necessidade ou não de intervenção cirúrgica. Os dois primeiros graus correspondem aos propostos por Seddon (1942), dessa forma, grau I, neurapraxia e grau II, axonotmese; já nos graus III e IV, considerando os aspectos histopatológicos da lesão, temos diferentes estruturas acometidas, sendo que no grau III, os axônios e o endoneuro estão danificados, mas o perineuro não é acometido; no grau IV, os

axônios, o endoneuro e o perineuro estão danificados, mas o epineuro está preservado e por fim, o grau V, que corresponde à neurotmeose, ou seja, a transecção completa do nervo.

1.2.2. Degeneração Walleriana

Descrita por Augustus Waller em 1850, a degeneração Walleriana (DW) é uma forma estruturada de degeneração axonal caracterizada inicialmente pela dissolução dos elementos do citoesqueleto axonal, produzindo detritos axonais e de mielina. É um fenômeno complexo que se inicia após lesões que levam à interrupção da continuidade axonal (WALLER, 1850; ALLODI et al., 2012; COLEMAN e HÖKE, 2020). Caracterizada pela perda do contato do axônio com o corpo neuronal, a LNP além de privar o axônio de sua fonte de síntese de proteínas, glicoproteínas, lipídios e carboidratos, deflagra uma série de respostas moleculares e celulares sucedidas por degeneração e posterior fragmentação de seu segmento distal (GORDON, 2020).

Ao ter a sua continuidade axonal interrompida, as fibras nervosas distais ao local da lesão perdem o contato com o corpo celular neuronal desencadeando uma cascata de eventos (Figura 5). Além das respostas celulares provocadas pelos axônios lesionados, a DW é acompanhada pela mudança das CSs, que assumem um fenótipo de reparo e pela ativação da resposta imune (CHEN; PIAO e BONALDO, 2015). As CSs iniciam o processo de depuração do microambiente facilitando a degradação da mielina e expressam fatores quimiotáticos que atraem as células do sistema imune inatas (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e células adaptativas (células T e B), dentre estas, os macrófagos se destacam pois são eles que auxiliam no processo de fagocitose tanto dos detritos axonais quanto de mielina a fim de produzir um ambiente que suporte e promova a regeneração e o crescimento axonal (GAUDET; POPOVICH e RAMER, 2011, HUANG et al., 2024). Os macrófagos também estão presentes nos gânglios da raiz dorsal (GRD) para regular o processo de regeneração do axônio. Em contraste com os nervos lesionados, o aumento de macrófagos nos GRDs origina-se principalmente da proliferação de macrófagos residentes, e não da infiltração de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos (HUANG et al., 2024). Em concomitância, no corpo celular, inicia-se um processo de cromatólise, onde o corpo celular incha devido à fragmentação dos corpúsculos de Nissl que se dispersam pelo citoplasma (ALLODI *et al.*, 2012).

Na porção axonal adjacente ao corpo celular, conhecida como coto proximal, inicia-se o processo de regeneração axonal. Este processo é iniciado através de

cones de crescimento, os quais se estendem em direção ao coto distal do axônio danificado. O crescimento direcional desses cones é guiado pelas CSs que se proliferam dentro da lâmina basal original formando as bandas de Büngner, ao longo do caminho até alcançar seu destino alvo. Uma vez lá, ocorre o estabelecimento de novas sinapses e o início do processo de remielinização do axônio regenerado (CHEN *et al.*, 2007; NAVARRO *et al.*, 2007; ALLODI *et al.*, 2012).

Após a conclusão bem-sucedida da regeneração axonal, as CSs restabelecem sua associação com o axônio. Isso resulta na interrupção da expressão de fatores tróficos e de seus receptores, e as CSs retomam sua diferenciação para um fenótipo mielinizante. Nesse processo, os segmentos do axônio são envolvidos, um de cada vez, por uma bainha composta por diversas camadas de membrana celular extensa. Essa mielinização progressiva resulta na formação dos nodos de Ranvier, os quais são caracterizados por uma interrupção na bainha de mielina. Esse processo de remielinização é crucial para a restauração da função axonal e é regulado por uma série de fatores (NAVE, 2010; ALLODI *et al.*, 2012; GLENN; TALBOT, 2013).

Hoje, sabe-se que a DW é uma resposta protetora e contribui para a recuperação da função nervosa, principalmente por propiciar um ambiente favorável para a regeneração (CHANG *et al.*, 2016).

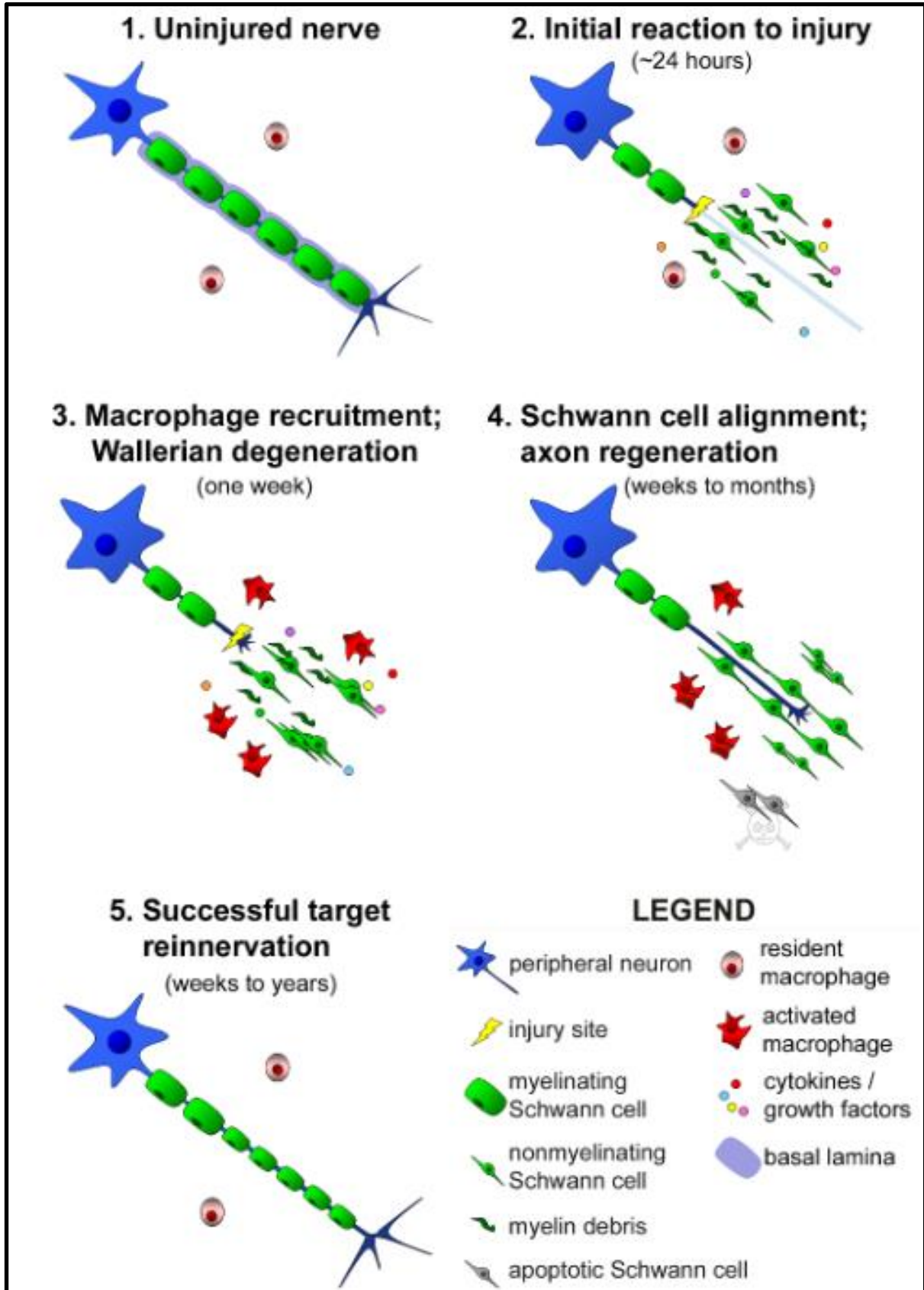


Figura 5. Progressão da degeneração Walleriana e regeneração de axônios após LNI. Um único axônio com CS mielinizantes associadas é mostrado. Embora a fagocitose e a degeneração da mielina ocorram dentro da lâmina basal (roxa), a lâmina basal é mostrada apenas no painel 1 para maior clareza. 1. Nervo íntegro. 2. Reação inicial à lesão. 3. Recrutamento dos macrófagos. 4. Alinhamento

das CS formando as bandas de Büngner. 5. Axônio regenerado com sucesso. Disponível em: GAUDET; POPOVICH e RAMER, 2011.

1.3. RESPOSTAS À LESÃO DO NERVO PERIFÉRICO

O SNP exibe uma alta capacidade regenerativa (NOCERA e JACOB, 2020). Existem três principais mecanismos de reparo após LNP: remielinização de axônios poupados e desmielinizados, brotamento colateral e regeneração axonal. Na neuropraxia, as CSs assumem um fenótipo de reparo, permitindo a produção de nova mielina (WANG et al., 2019; MODRAK et al., 2020). Lesões axonais parciais se recuperam através do brotamento colateral, aumentando o número de fibras musculares controladas por um único axônio. Em lesões completas, como no caso da transecção, a recuperação depende de uma taxa de regeneração axonal de aproximadamente 1 mm/dia, em humanos, com alguma variação desta taxa relacionada a fatores do paciente (idade) e fatores da lesão (local da lesão, mecanismo da lesão, proximidade da lesão ao corpo celular, tempo e tipo de reparo) principalmente por afetar a capacidade regenerativa intrínseca dos axônios (GORDON, SULAIMAN e BOYD, 2003; NAVARRO et al., 2007, IRISARRI, 2023). Durante a regeneração, pode ocorrer formação de fibrose, dificultando a recuperação. Nas lesões mais graves, a desorganização fascicular e a presença de fibroses no nervo prejudicam ainda mais a recuperação, especialmente para as fibras motoras. As fibras sensoriais podem ter uma recuperação ligeiramente melhor (LOPES et al., 2022).

O reparo do nervo lesionado acontece em diversos estágios, abrangendo o corpo da célula nervosa, o segmento entre o neurônio e a área danificada (coto proximal), o próprio local da lesão, o segmento entre a área lesada (coto distal) e o órgão alvo (MODRAK et al., 2020).

1.4. ESTRATÉGIAS DE REPARO

Geralmente, a principal estratégia utilizada na clínica é a neurorrafia, sendo considerada o padrão-ouro para lesões com menos de 3 cm de distância entre cotos nervosos (HOUSHYAR, BHATTACHARYYA e SHANKS, 2019). Esta se dá pela sutura coto a coto do nervo seccionado, sendo necessária a congruência entre as fibras para que a regeneração ocorra de forma adequada. Para lesões mais extensas a estratégia amplamente utilizada é o enxerto, ou seja, o nervo acometido é substituído por outro nervo do mesmo indivíduo (autoenxerto) ou de aloenxerto (enxerto de indivíduos geneticamente diferentes, mas que pertencem à mesma

espécie). O mais comum é a utilização de nervos sensitivos para realização do enxerto no qual normalmente utiliza-se o nervo sural, que é um nervo majoritariamente sensitivo (KHALED et al., 2023).

Dada as desvantagens das estratégias citadas anteriormente, a falta de resultados significativos na restauração da funcionalidade prévia e ao avanço da tecnologia e das técnicas disponíveis, outras estratégias passaram a ter um maior foco, como a tubulização (GOULART et al., 2014; GOULART et al., 2016; MARTINEZ et al., 2018; DURÇO et al., 2020), as terapias celulares (GOULART et al., 2014; DURÇO et al., 2020), terapias gênicas (MODRAK et al., 2020), e as terapias moleculares com a utilização da inosina (CARDOSO et al., 2019). Outras estratégias complementares podem ser utilizadas para potencializar a regeneração e a recuperação funcional, como as terapias baseadas em exercícios (GOULART et al., 2014).

Ainda que as abordagens terapêuticas utilizadas para acelerar a regeneração e recuperar as funções do nervo periférico sejam amplamente conhecidas, restabelecer a funcionalidade prévia à lesão tem se mostrado um grande desafio na prática clínica. Por isso, diversas modalidades terapêuticas vêm sendo estudadas de forma isolada ou combinadas (MODRAK et al., 2020; KHALED et al., 2023).

Neste trabalho, escolhemos algumas estratégias que são amplamente estudadas em nosso grupo de pesquisa, como a tubulização, como modelo de reparo (GOULART et al., 2014; MARTINEZ et al., 2018; DURÇO et al., 2020) e, como estratégias de tratamento, a inosina (CARDOSO et al., 2019) e o exercício em esteira (GOULART et al., 2014). Além disso, a literatura descreve diversos benefícios de tais estratégias, como podemos observar a seguir.

1.4.1. Tubulização

Como alternativa para as lesões mais graves e extensas onde o autoenxerto costuma ser a estratégia adotada como conduta inicial, vem sendo estudado o uso de enxertos tubulares, também conhecido como tubulização, que a princípio eram feitos de material sintético, visando reconstruir e reconectar as extremidades do nervo transecionado, reduzindo então as evoluções negativas citadas previamente. Diversos materiais biológicos já foram testados como veias descalcificadas de dentro para fora, vasos sanguíneos, artérias, xenoenxertos, fibras musculares, conduítes ósseos, dentre outros. No entanto, há preocupações sobre seu uso devido à disponibilidade limitada e formação de neuroma, resultando em sensação de dor e

morbidade do local doador (HOUSHYAR, BHATTACHARYYA e SHANKS, 2019; VIJAYAVENKATARAMAN, 2020; KHALED, 2023).

Os enxertos eram produzidos a partir de diferentes tipos de polímeros sintéticos, sendo os seus materiais e formatos adaptados para a demanda específica do nervo lesionado, evitando então torções e luxações, que eram comumente encontrados na clínica após a enxertia com materiais biológicos, além disso, podendo guiar a direção do nervo em regeneração, isolar o axônio regenerado do tecido cicatricial e proteger o nervo regenerado contra a compressão circundante (CHIONO e TONDA-TURO, 2015; HOUSHYAR, BHATTACHARYYA e SHANKS, 2019).

Ao longo do tempo, os enxertos tubulares sintéticos de materiais não biodegradáveis foram sendo substituídos por enxertos tubulares biodegradáveis. Dessa forma, não é necessária a realização de uma nova intervenção para retirada da órtese. Por serem feitos de polímeros biocompatíveis e bioabsorvíveis, os tubos biodegradáveis se tornaram a principal e mais promissora estratégia para permitir uma regeneração mais eficaz e com um menor risco de eventos adversos à intervenção. Por ser uma boa alternativa aos enxertos nos casos em que há perda de tecido nervoso que impossibilita a neurografia direta, muitos estudos seguem modelos utilizando enxertos tubulares, como alguns estudos do nosso grupo de pesquisa, nos quais foram utilizados enxertos de poli-ácido láctico (PLA, do inglês “*polylactic acid*”) (GOULART et al., 2014; GOULART et al., 2016; MARTINEZ et al., 2018; DURÇO et al., 2020).

1.4.2. Inosina

Uma das estratégias comumente utilizadas e que possui resultados promissores na regeneração é a terapia molecular. Dentre elas, o uso da inosina tem sido amplamente estudado em modelos de lesão no SNC (BENOWITZ et al., 1999; HASKÓ, SITKOVSKY e SZABÓ, 2004; LIU et al., 2006; CONTA e STELZNER, 2008; KURICOVA et al., 2014; MUTO et al., 2014).

A Inosina é um nucleosídeo de purina, produto da deaminação da adenosina, e possui propriedades imunomoduladoras, neuroprotetoras e analgésicas. Esses efeitos refletem diretamente no potencial terapêutico observado nos processos patológicos (PINTO et al., 2021). Formada nos meios intracelular e extracelular, a inosina possui inúmeros mecanismos de ação, tais como ligação aos receptores de adenosina ou P1 (RALEVICK e BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK e RALEVIC, V, 2013), aumento da produção de ácido úrico, que possui características antioxidantes

por eliminar o peroxinitrito, garantindo a neuroproteção devido à diminuição do estresse oxidativo (CONTA e STELZNER, 2008; TOMIGA et al., 2020) e regulação da proteína GAP-43, além da ativação da enzima Mst3b, desempenhando um papel importante na via de sinalização de fatores tróficos, cruciais no processo de crescimento axonal (IRWIN et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016). Essas características dão à esta purina um potencial imunomodulador, além de ser um agente neuroprotetor (HASKÓ, SITKOVSKY e SZABÓ, 2004; LIU et al., 2006; CONTA e STELZNER, 2008). Além disso, a inosina atua através da ligação a um dos quatro subtipos de receptores de adenosina ou P1R: A1, A2A, A2B e A3, que se encontram expressos em células de tecidos como encéfalo, medula espinal, baço e, principalmente, em leucócitos, células imunes de origem linfóide (JUNQUEIRA et al., 2016). Dentre eles, acredita-se que os receptores A2A e A2B apresentam papel crucial no controle da inflamação (VIRGILIO e VUERICH, 2015). Pode-se considerar também o aumento da degranulação dos mastócitos através do envolvimento com receptores A3, diminuição *in vitro* na produção de algumas citocinas anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1) em macrófagos, linfócitos e neutrófilos (HASKÓ, SITKOVSKY e SZABÓ, 2004). Ademais, a inosina garante a preservação de células gliais e neuronais durante privação de glicose e oxigênio, através do seu metabolismo intracelular. A enzima purina nucleosídeo fosforilase degrada a inosina em hipoxantina, liberando nesse processo uma ribose-1-fosfato, que se isomeriza a outras três riboses-1-fosfato, formando uma ribose-5-fosfato. Esta nova ribose-5-fosfato é convertida por enzimas da cadeia das pentoses (transaldostases e transquelotases) em glicose-6-fosfato, e este intermediário entra na via glicolítica, formando moléculas de ATP (JURKOWITZ et al., 2002; HASKÓ, SITKOVSKY e SZABÓ, 2004). Esses mecanismos estão representados na figura 6.

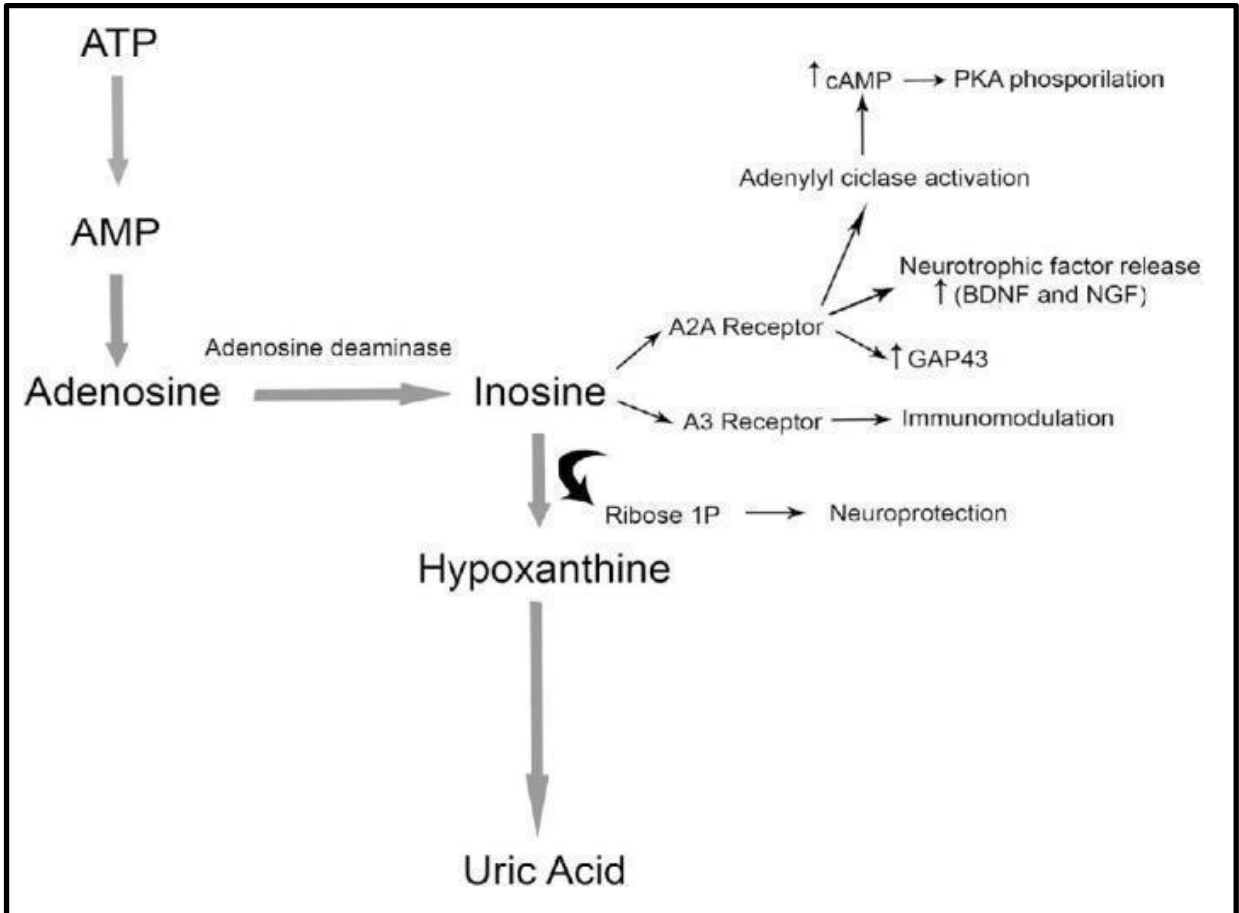


Figura 6. Representação esquemática da degradação da inosina e seus mecanismos de ação. Disponível em: ALMEIDA, CARDOSO e MARTINEZ, 2021.

Recentemente, um estudo do nosso grupo apresentou resultados positivos do uso da inosina em um modelo compressivo do nervo isquiático (CARDOSO et al., 2019), sendo o pioneiro no uso dessa molécula no SNP. Nesse caso, o tratamento com inosina foi capaz de promover neuroproteção, evitando a morte de neurônios no corno anterior da medula espinal e nos GRD, além de acelerar a regeneração do nervo isquiático e reduzir o número de macrófagos circulantes duas semanas após a lesão, indicando a aceleração do processo inflamatório e antecipando a recuperação das funções motoras e sensoriais.

1.4.3. Exercício

Outra estratégia terapêutica que tem demonstrado efeitos benéficos é a realização do exercício físico. Assim como a inosina, o exercício físico tem demonstrado efeitos benéficos tanto na regeneração do nervo lesionado quanto na recuperação das funções motoras e sensitivas em diferentes modelos de lesão do sistema nervoso (GOULART et al., 2014; GORDON e ENGLISH, 2015; ALVES et al.,

2018; SUN et al., 2019; JAISWAL, et al., 2020; DAVAA et al., 2021; BILCHAK, CARON, e CÔTÉ, 2021; KUMAR et al., 2021).

O exercício físico após lesão axonal leva ao consumo de ATP celular, resultando na ativação de AMPK promovendo a regeneração de axônios e recuperação funcional (KUMAR et al., 2021). O exercício aeróbico pode ainda promover a expressão da óxido nítrico sintase que pode promover o reparo do tecido nervoso (SUN et al., 2019). Além disso, o exercício tem capacidade de normalizar a regulação positiva de fator de crescimento nervoso (NGF, do inglês “*Nerve Growth Factor*”) e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês “*Brain Derived Neurotrophic Factor*”) induzida por lesão nervosa, estando associado a uma regeneração nervosa periférica mais rápida (ALVES et al., 2018). Os efeitos benéficos do exercício físico ainda estão associados à atividade do motoneurônio, sendo esta necessária para melhorias na recuperação da função motora (JAISWAL, et al., 2020). Terapias baseadas em exercícios estão associadas a inúmeras formas de plasticidade, que vão desde a formação de novos circuitos, prevenção de apoptose e crescimento axonal que provavelmente contribuem para o reparo neural e recuperação funcional, possivelmente relacionadas à síntese de fatores tróficos (BILCHAK, CARON, e CÔTÉ, 2021). Além disso, mudanças epigenéticas no córtex motor do cérebro desencadeadas pelo exercício podem contribuir para melhorias funcionais induzidas pelo exercício (DAVAA et al., 2021).

Apesar de possuírem inúmeros benefícios já descritos, o uso combinado da inosina e do exercício físico podem se tornar complementares. Ambos demonstraram ter efeito neuroprotetor e imunomodulatório, porém não se sabe se a combinação dessas duas estratégias pode potencializar seus efeitos além de acelerar a regeneração do nervo periférico e antecipar a recuperação funcional.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do exercício em esteira e da inosina na regeneração do nervo isquiático, após lesão e reparo do nervo isquiático em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do exercício em esteira e do tratamento com inosina na recuperação motora dos animais submetidos à lesão por transecção e tubulização do nervo isquiático, através do Índice de Função do Isquiático;

- Avaliar os efeitos do exercício em esteira e do tratamento com inosina na recuperação da sensibilidade dos animais submetidos à lesão por transecção e tubulização do nervo isquiático, através dos testes da picada do alfinete e de pressão crescente na pata;
- Avaliar os efeitos do exercício em esteira e do tratamento com inosina na regeneração do nervo isquiático dos animais submetidos à lesão por transecção e tubulização através da eletrofisiologia;
- Verificar, através da microscopia eletrônica de varredura, a ultraestrutura da órtese tubular antes do implante e se há regeneração do nervo isquiático no seu interior ao final da sobrevivência dos animais.
- Avaliar os efeitos do exercício em esteira e do tratamento com inosina na regeneração dos nervos isquiáticos dos animais submetidos à lesão por transecção e tubulização deste nervo através de imuno-histoquímica para os receptores **A2A** e **NF200** e análises dos cortes semifinos e ultrafinos;
- Avaliar os efeitos do exercício em esteira e do tratamento com inosina dos animais submetidos à lesão por transecção e tubulização do nervo isquiático através da quantificação dos neurônios no corno anterior da medula espinal e nos gânglios da raiz dorsal;
- Avaliar os efeitos do exercício em esteira e do tratamento com inosina na morfologia dos músculos gastrocnêmios dos animais submetidos à lesão por transecção e tubulização.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Foram utilizados camundongos machos, adultos (8-12 semanas de idade) da linhagem C57/Bl6 que foram pesados e anestesiados com Ketamina (100 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal. Assim que os animais apresentaram o efeito da anestesia, foi realizada a tricotomia do membro posterior direito de cada animal e o nervo isquiático foi exposto através de uma incisão longitudinal na face posterior do terço proximal da coxa utilizando uma lâmina de bisturi nº10, sem secção muscular. Após exposição, o nervo isquiático foi transecionado com auxílio de uma micro tesoura oftálmica, em sua porção proximal à 2 mm do forame isquiático maior e, o nervo foi suturado na extremidade proximal e distal do enxerto tubular de PLA, através do epineuro, com um fio de monofilamento de nylon 10.0. O comprimento total da órtese foi de 5mm e, as suturas foram feitas de modo a deixar um intervalo de 3

mm entre as porções proximais e distais do nervo. Após a transecção e tubulização, a musculatura foi reposicionada sobre o nervo e a pele do animal foi suturada utilizando um fio de monofilamento de nylon 6.0. Por fim, o animal foi transferido para uma gaiola onde permaneceu em repouso até sua recuperação. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com auxílio de uma lupa cirúrgica com aumento de 12 e 20 vezes (Opto FI04, SP, Brasil) para melhor visualização.

Este trabalho foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, conforme o Protocolo n° 089/22 estando todos os procedimentos realizados na pesquisa de acordo com as recomendações do comitê de ética.

3.2. PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DOS TRATAMENTOS

3.2.1. Inosina

Para o preparo da solução salina 0,9% utilizamos 0,9 g de Cloreto de Sódio (Sigma Aldrich®) em 100 ml de água destilada e para o preparo da solução Inosina foram utilizadas 2,8g de Inosina (Sigma Aldrich®) + 40 mg de bicarbonato de sódio em 40 ml de água mili-q. 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 a 2 M (Sigma Aldrich®)

Uma hora após a lesão por transecção, os animais foram separados randomicamente em quatro grupos de acordo com o tratamento administrado, e receberam solução salina ou inosina (dose de 70 mg/ml). O tratamento foi administrado durante sete dias, por via intraperitoneal, iniciando 1 hora após a cirurgia e sendo finalizado no 7º dia previamente à realização do primeiro teste funcional e do início do protocolo de exercício.

3.2.2. Protocolo de exercício físico

Os animais foram submetidos a ambientação de uma semana com o aparelho de esteira antes do início dos protocolos experimentais. O treinamento em esteira foi iniciado no 7º dia após a lesão. Os camundongos foram colocados em uma esteira motorizada (Insight, Brasil) em uma velocidade de banda de 6-12 m/min, de acordo com as capacidades do animal, e foram treinados em períodos de exercícios de 10 min, 3 dias por semana (às segundas, quartas, e sextas-feira), conforme descrito por Goulart e colaboradores (2014), e Massoto e colaboradores (2020). Os animais realizaram o protocolo na esteira nessa velocidade com pouca ou nenhuma

persuasão. O protocolo de treinamento foi realizado semanalmente, até completar 8 semanas da data da cirurgia, totalizando 7 semanas de treinamento. Os grupos salina e inosina foram manuseados e colocados em esteira sem movimento pelo mesmo tempo que os grupos exercitados, para evitar viés de estresse pela manipulação entre os grupos.

3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para analisar os efeitos do exercício físico e da inosina na regeneração do nervo isquiático, após lesão por transecção e reparo com órtese tubular em camundongos, os animais foram divididos em 4 grupos:

Grupos	Procedimento
Salina	Animais foram submetidos à cirurgia e posteriormente tratados com solução salina por via intraperitoneal
Inosina	Animais foram submetidos à cirurgia e posteriormente tratados com solução Inosina por via intraperitoneal
Salina + Exercício	Animais foram submetidos à cirurgia e posteriormente tratados com solução salina por via intraperitoneal. Além disso, realizaram o protocolo de exercício em esteira.
Inosina + Exercício	Animais foram submetidos à cirurgia e posteriormente tratados com solução inosina por via intraperitoneal. Além disso, realizaram o protocolo de exercício em esteira.

Tabela 1. Tabela com a descrição dos 4 grupos utilizados e procedimentos aos quais foram submetidos.

3.4. DESENHO EXPERIMENTAL

Abaixo está representado um desenho experimental de todas as etapas do estudo. (Figura 7).

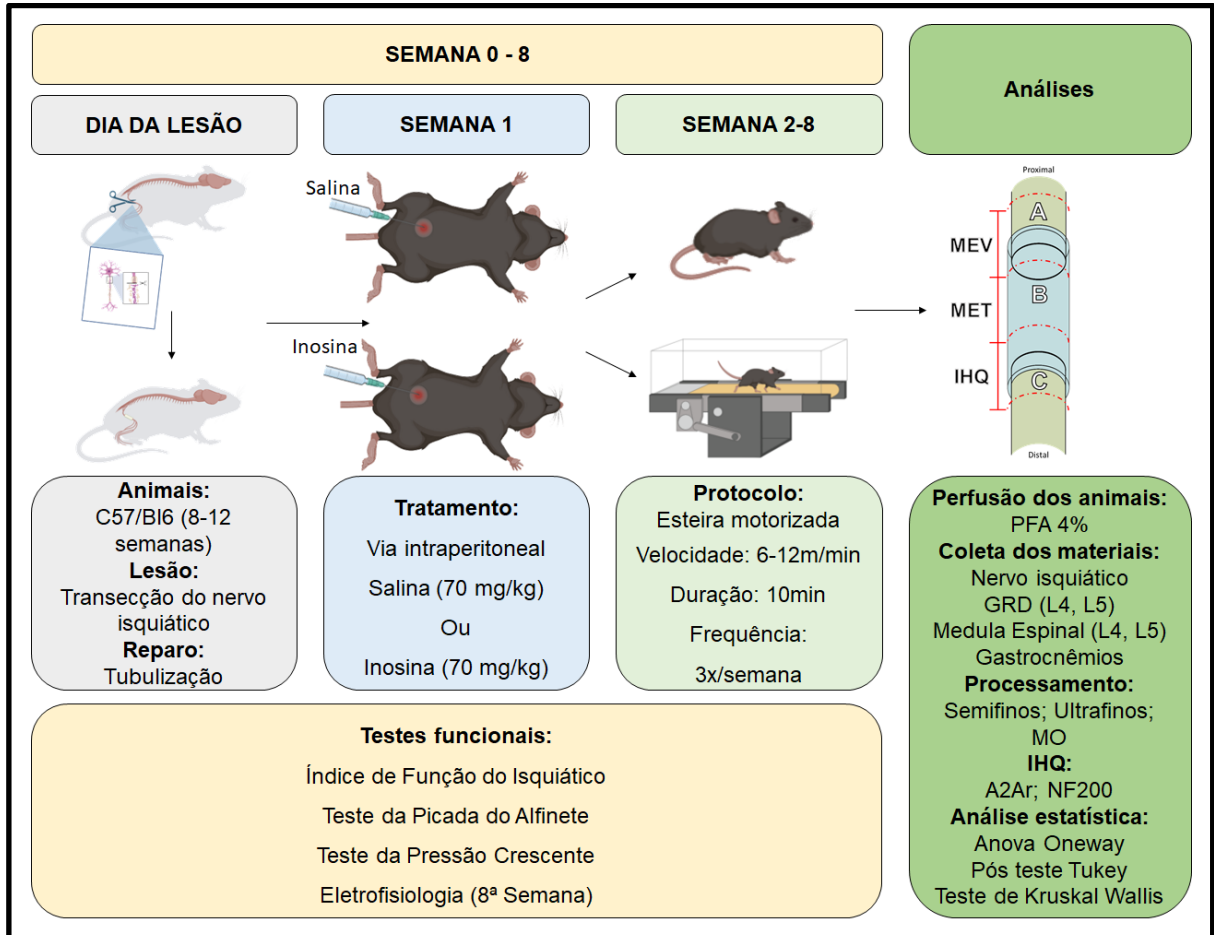


Figura 7. Desenho experimental. Representação gráfica dos materiais e métodos utilizados neste estudo.

3.5. TESTES FUNCIONAIS

3.5.1. Índice de função do isquiático

Para a análise da marcha do animal, realizamos o Índice de Função do Isquiático (IFI) no período pré-operatório e semanalmente até a oitava semana após a lesão. Para isso, utilizamos um corredor com 45 x 6,5 cm que permite que os animais caminhem livremente por todo seu trajeto (DE MEDINACELI, FREED e WYATT, 1982; INSERRA, BLOCH e TERRIS, 1998), a fim de obter a impressão das suas pegadas. O fundo do corredor por onde o animal caminhou foi recoberto com um papel Canson branco (A4 140 g/m²) e suas patas posteriores foram pintadas com tinta preta à base d'água. Então, o animal foi colocado gentilmente para caminhar livremente pelo corredor. Após obtenção da impressão das patas, foram escolhidas aquelas nas quais o animal andava num passo moderado para posterior mensuração e quantificação. Caso houvesse necessidade, os animais repetiam o teste até que fossem obtidas marcações mensuráveis (INSERRA, BLOCH e TERRIS, 1998).

Para análise do IFI, foram medidos os parâmetros de abertura dos dedos (TS), que compreende a distância entre o primeiro e quinto dedos, e o comprimento da pegada (PL), que compreende a distância entre o terceiro dedo e o coxim traseiro. Estas medidas foram obtidas tanto do lado experimental (E) quanto do lado normal (N), e calculadas usando a fórmula proposta por INSERRA, BLOCH e TERRIS (1998):

$$IFI = 118,9 * \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) - 51,2 * \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right)$$

Onde: IFI = Índice de função do isquiático; ETS = Abertura dos dedos da pata com lesão; NTS = Abertura dos dedos da pata sem lesão; EPL= Comprimento da pata com lesão; NPL = Comprimento da pata sem lesão.

3.5.2. Teste da picada do alfinete (Pin Prick Test)

Para avaliação da sensibilidade dolorosa cutânea no período pré-operatório e semanalmente até a oitava semana após a lesão, utilizamos o teste da picada do alfinete, no qual os animais foram alocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² composta de arame não maleável de 1 mm de espessura, com espelhos posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação, facilitando a visualização das plantas das patas dos animais. Após a adaptação dos animais ao ambiente do teste, um alfinete entomológico (alfinete entomológico fabricado em aço inox sem estanho, 0,25 mm de diâmetro – Papillon) foi gentilmente pressionado na superfície plantar das patas traseiras, sem movê-las ou penetrar na pele do animal (DECOSTERD e WOOLF, 2000). A superfície plantar lateral da pata traseira innervada pelo nervo isquiático foi dividida em 5 áreas. Uma resposta foi considerada positiva quando o animal rapidamente removeu sua pata, e o camundongo recebeu uma pontuação de 1 para esta área, sendo então testado para a próxima. Se nenhuma das aplicações obteve resposta positiva, a nota geral foi 0. A pontuação do teste varia entre 0 (perda total da sensibilidade dolorosa cutânea) e 5 (sensibilidade dolorosa cutânea normal) (Ma et al., 2011).

3.5.3. Teste de pressão crescente na pata (Analgesímetro digital - Von Frey eletrônico)

Para avaliar a sensibilidade ao estímulo mecânico, utilizamos o estesiômetro eletrônico (Modelo EFF 302 – Analgesímetro Digital (Von Frey), Insight Instruments), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,1 g. O aparelho foi calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força

de 80 g. O contato do transdutor de pressão com a pata dos animais foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada a este. Os camundongos foram colocados no mesmo aparato espelhado descrito no tópico 3.5.2. Foi aplicada, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produzisse uma resposta caracterizada como sacudida da pata estimulada. O valor expresso no aparelho no momento da retirada da pata foi observado e anotado. Realizamos 3 estímulos, e a média dos valores expressos em gramas foi utilizada.

3.5.4. Eletroneuromiografia

Para analisar a regeneração axonal após lesão por transecção e tubulização do nervo isquiático, realizamos a eletroneuromiografia. Os animais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal e o nervo isquiático foi novamente exposto conforme descrito anteriormente, bem como o músculo gastrocnêmio e seu tendão. Com as estruturas expostas, foi utilizado o aparelho PowerLab 4/35 (AdInstruments – PowerLab 4/35), um estímulo elétrico foi deflagrado sobre o nervo isquiático, através de um eletrodo bipolar em gancho, com catodo distando 2mm do anodo. Foram utilizados eletrodos de agulha para registro do potencial de ação muscular composto (PAMC) representado na figura 8. O eletrodo ativo foi inserido no músculo gastrocnêmio, enquanto o eletrodo referência foi posicionado sobre seu tendão. O eletrodo de aterramento foi posicionado sob a pele do animal. O programa foi configurado para liberar um estímulo de 10V. O PAMC do nervo foi analisado através do Software LabChart 8 (AdInstruments). Os parâmetros analisados foram amplitude (mV), latência (ms) e velocidade de condução nervosa (m/s) do PAMC, de onde poderemos inferir o número de fibras musculares reinervadas. A Velocidade de Condução Nervosa (VNC) foi calculada através da determinação do tempo que o estímulo levou para percorrer a distância entre os locais de estimulação da Latência Proximal (LP) e da Latência Distal (LD); isto é, o tempo de condução. Esse tempo, expresso em milissegundos (ms), pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Tempo de condução} = LP - LD$$

A latência pode ser definida como o tempo entre a aplicação do estímulo e o início da deflexão da resposta obtida nos dois locais de estimulação; proximal e distal. Para que fosse medida a distância entre os dois locais de estimulação, foi marcado o centro entre os eletrodos utilizados para a aplicação do estímulo, tanto nos locais de

estimulação proximal quanto distal, medindo-se, portanto, em milímetros (mm) a distância entre eles. A VCN (em metros por segundo, m/s) foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$VCN (m/s) = \left(\frac{\text{Distância entre os dois locais de estimulação (mm)}}{\text{Tempo de condução (ms)}} \right)$$

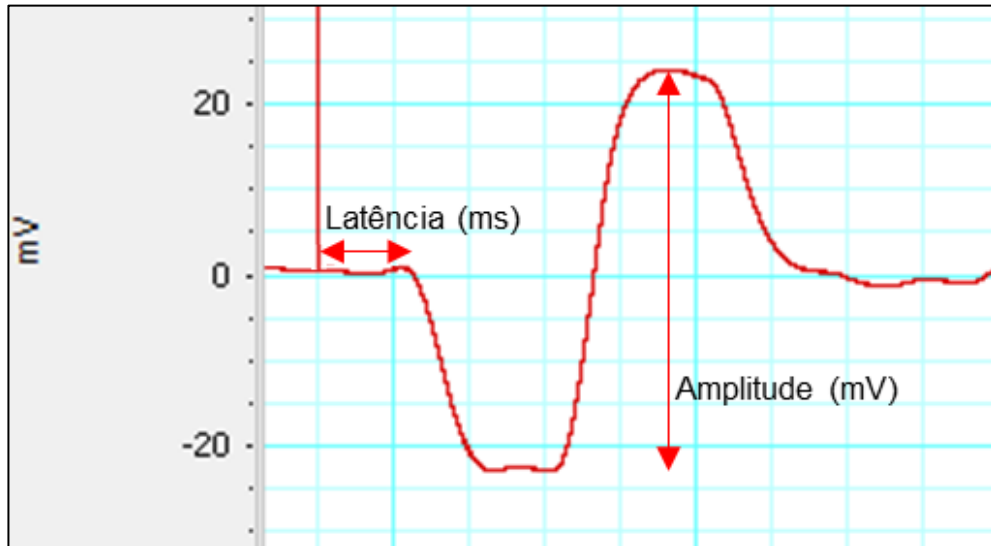


Figura 8. Representação do PAMC. No traçado acima podemos observar como foram obtidos os valores de amplitude (mV) e latência (ms) dos animais analisados. Sendo a amplitude o valor da distância entre o ponto mais alto (crista) e mais baixo da onda (vale). Para latência, foi considerada a distância entre o ponto inicial de registro do estímulo e o ponto onde a onda começa a decrescer.

3.6. PERFUSÃO E OBTENÇÃO DOS TECIDOS

Oito semanas após o tratamento, os animais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) e perfundidos intracardialmente com uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% (PFA 4%) em Tampão Fosfato a 0,1 M ou PFA 4% + Glutaraldeído a 2% em Tampão Fosfato a 0,1M. Após a perfusão, os animais foram dissecados e foram retirados os seguintes materiais: músculos gastrocnêmios direito e esquerdo, nervo isquiático direito (experimental) e esquerdo (controle); medula espinal no nível de L4-L5; GRD a nível de L4 e L5 direito e esquerdo; 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 abaixo (Figura 9). Após a dissecação os segmentos A e B foram deixados em um eppendorf para pós-fixação em Tampão Cacodilato 0,1M + Glutaraldeído 2,5% e os demais materiais foram preservados em eppendorfs em PFA 4%.

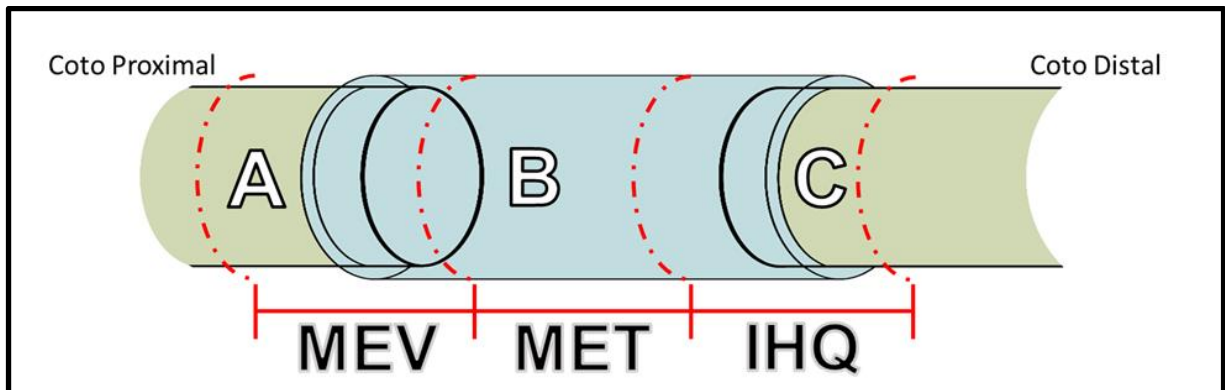


Figura 9. Esquema ilustrativo dos três segmentos do nervo e seus respectivos processamentos. **A.** Segmento proximal do nervo processado para microscopia eletrônica de varredura (MEV); **B.** Segmento médio do nervo regenerado, processado para microscopia eletrônica de transmissão (MET); **C.** Segmento distal à lesão, processado para as análises imunohistoquímicas (IHQ). Imagem de própria autoria.

3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para verificar as características gerais da órtese tubular e a presença de nervo em seu interior, utilizamos a microscopia eletrônica de varredura (MEV), oito semanas após a cirurgia. Após a fixação por imersão, como descrito anteriormente, o segmento A de cada nervo foi lavado em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4), pós-fixado em OsO₄ 1% + 0,8% de ferrocianeto de potássio + 5 nM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4), por duas horas, e em seguida foi lavado em tampão cacodilato 0,1M e água destilada. O segmento foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80% e 90%, por duas vezes de cinco minutos cada, e 100%, por duas vezes de 15 minutos) e solução de hexametildisilazano (HMDS) (primeiramente em uma proporção de 1:1 com etanol 100% e, em sequência, isoladamente com HMDS 100% por 10 minutos cada). Por fim, a amostra foi metalizada através de um metalizador (Denton Vacuum Desk II, Estados Unidos da América). As amostras foram posicionadas cuidadosamente num suporte contendo fita de adesiva de carbono e pulverizadas com ouro por 30 segundos a 40 m. O suporte contendo as amostras foi levado ao microscópio eletrônico de varredura (EVO MA10 - ZEISS) para análise e obtenção das eletromicrografias. O tubo biodegradável não implantado também foi analisado por este método, visando a sua caracterização ultraestrutural.

3.8. PREPARO DO MATERIAL PARA CORTES SEMIFINOS E ULTRAFINOS E ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Após a fixação por perfusão e a pós-fixação em Tampão Cacodilato 0,1 M + Glutaraldeído 2,5% ou PFA 4% como citados anteriormente, foram separados para

processamento para microscopia eletrônica os seguintes materiais: os segmentos B dos nervos isquiáticos direito e esquerdo. Os materiais foram lavados em Tampão CaCO 0,1 M três vezes e pós fixados numa mistura de Tetróxido de Ósmio 1% em Tampão CaCO 0,1 M, Ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio a 50 nM por aproximadamente 2 horas. As amostras foram lavadas em Tampão CaCO 0,1 M 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), desidratadas em uma bateria gradual de acetonas (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%), emblocadas em resina epóxi, e deixadas numa estufa a 60°C para polimerização por 48 horas.

Após a polimerização, cada bloco foi desbastado para retirada do excesso de resina e cortes transversais semifinos de 300 nm foram feitos em um ultramicrotomo (MT-600-XL-RMC, inc). Os cortes semifinos foram colocados em lâminas e corados com azul de toluidina para análise através de um microscópio óptico (Zeiss Axioscope 2 plus). Os cortes ultrafinos foram obtidos no mesmo ultramicrotomo, com espessura entre 60 e 70 nanômetros, coletados em grades de cobre com 300 quadrículas e contrastados em solução aquosa de acetato de uranila (5%) durante 30 minutos e em citrato de chumbo (1%) durante 10 minutos. As grades contrastadas foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão, modelo Zeiss 900, operado a 80 kV, em uma magnitude de 6000x.

Para as análises morfométricas, amostras de cinco áreas dos mesmos cortes semifinos transversais foram obtidas em uma ampliação de 100x, como ilustrado na figura 10. Para cada amostra, os seguintes parâmetros foram calculados: área da fibra, área do axônio, área da mielina e razão G. A área de mielina foi medida subtraindo a área do axônio da área da fibra. A razão G foi calculada dividindo o diâmetro axonal interno pelo diâmetro externo da fibra e os resultados foram separados em faixas de 0-0,12, 0,13-0,26, 0,27-0,40, 0,41-0,54, 0,55-0,68, 0,69-0,82, 0,83-1,0. Além disso, foi obtida a média das razões G. A razão G mais eficiente do nervo isquiático está em torno da faixa de 0,55 a 0,68 (Chomiak e Hu, 2009).

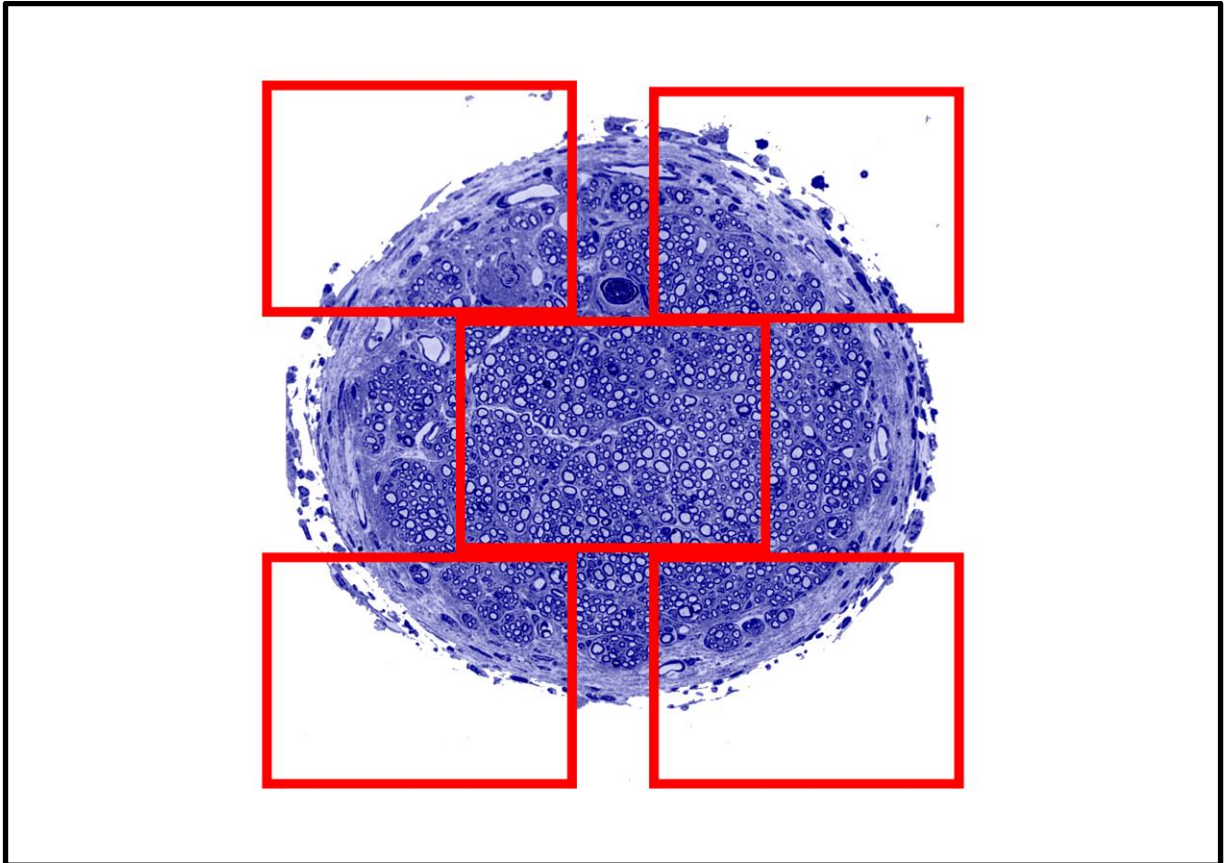


Figura 10. Esquema ilustrativo das 5 áreas quantificadas em cada amostra. Cada imagem das seções transversais semifinas foi obtida em uma ampliação de 100x e cinco áreas foram quantificadas a fim de obter a área da fibra, área do axônio, área da mielina e razão G de cada amostra.

3.9. MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

Após a dissecação e a pós-fixação como citados anteriormente, foram separados para cortes congelados os seguintes materiais: os segmentos C dos nervos isquiáticos direito e esquerdo, medula espinal e gânglios da raiz dorsal direito e esquerdo. Os materiais foram lavados em tampão fosfato 0,1M três vezes e crioprotetidos em sacarose 10%, 20% e 30% + tampão fosfato a 0,1 M. Após o final da crioproteção, os materiais foram congelados em OCT (Tissue Tek®). Após congelamento, cortes de 10µm de espessura dos nervos Isquiáticos, de 12µm de espessura dos GRD e de 20µm de espessura de medula espinal foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850) e coletados em lâminas gelatinizadas para realização das imuno-histoquímicas e colorações de rotina.

3.10. IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Para visualizar a presença dos neurofilamentos e sua localização, realizamos uma marcação por IHQ para NF200 (SIGMA, diluição 1:1.000). Além disso, foi realizada uma outra marcação para o receptor A2A (Invitrogen, diluição 1:200) a fim

de investigar os mecanismos envolvidos no processo de regeneração dos nervos. Para tal, foram utilizadas lâminas contendo os cortes das amostras estudadas (conforme descrito no item 3.9 para MO). As lâminas foram inicialmente colocadas na estufa a 37°C por cinco minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes 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% 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, colocamos o anticorpo primário, por toda a noite na geladeira a 4°C, em câmara escura e úmida.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS quatro vezes por 5 minutos cada, seguida de adição do anticorpo secundário (Alexa 488 e Alexa 546, diluição 1:600) por uma hora e meia. Logo após as lâminas terem sido lavadas uma vez por dez minutos em PBS, colocamos o marcador nuclear DAPI, numa diluição de 1:10.000 em água destilada. Por fim, as lâminas foram lavadas em PBS quatro vezes por 5 minutos e uma vez em água destilada e, por fim, montadas com lamínulas utilizando Fluoromount (SIGMA-4680, USA).

IHQ	Produzido em/ Fluoresce em	Diluição	Fabricante
Anticorpo Primário Policlonal (Anti-A2Ar)	Coelho	1:200	Invitrogen
Anticorpo Primário Monoclonal (Anti-NF200)	Camundongo	1:1.000	SIGMA
Anticorpo Secundário Alexa Fluor 488 Cabra anti-camundongo	Verde	1:600	Invitrogen
Anticorpo Secundário Alexa Fluor 546 Cabra anti-coelho	Vermelho	1:600	Invitrogen

Tabela 2. Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados.

3.11. QUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS SENSITIVOS DOS GRD E DOS MOTONEURÔNIOS DA MEDULA ESPINAL

Para avaliar efeito neuroprotetor do exercício em esteira e da inosina quantificamos os motoneurônios no corno anterior da medula espinal nas alturas de L4 e L5 e os neurônios sensitivos nos GRD de L4 e L5. Para a quantificação dos neurônios no corno anterior da medula, utilizamos 5 cortes transversais de 20µm, obtidos através do criostato e corados com cresil violeta a 0,1% (Nissl), e a partir das micrografias com aumento de 20 vezes, realizamos a quantificação dos nucléolos dos motoneurônios presentes no corno anterior da medula nos grupos. Para garantir que apenas os motoneurônios sejam contados, traçamos uma linha perpendicular e anterior ao canal central da medula espinal.

Para quantificarmos os nucléolos dos neurônios sensitivos nos GRD, utilizamos oito cortes transversais, de 12 µm, obtidos através do criostato e corados com cresil violeta a 0,1% (Nissl) e a partir das micrografias com aumento de 20 vezes.

3.12. ANÁLISE DOS MÚSCULOS GASTROCNÊMIOS

Para as análises do peso seco (em gramas) dos músculos gastrocnêmios do lado ipsilateral à lesão e ao contralateral, amostras de tecido fixadas em paraformaldeído a 4% foram pesadas em uma balança analítica após serem levadas para secagem com auxílio de papel de filtro até que o peso se mantivesse constante. Posteriormente o peso seco do músculo gastrocnêmio do lado ipsilateral à lesão foi normalizado utilizando como denominador o peso seco do músculo gastrocnêmio do lado contralateral à lesão (sadio).

Para analisar o número de fibras musculares e a área média das fibras musculares de cada grupo, amostras de tecido fixado em paraformaldeído a 4% foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M três vezes e crioprotetidos em sacarose 10%, 20% e 30% + tampão fosfato a 0,1 M. Após o final da crioproteção, os materiais foram congelados em OCT (Tissue Tek®) e, posteriormente, congelados a -20°C. O material já congelado foi cortado em criostato (Leica CM 1850), obtendo-se cortes transversais com 20 µm de espessura. Foram colhidos 4 cortes seriados em lâminas gelatinizadas e armazenados para posterior realização da coloração de rotina. Para a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), os cortes foram levados para uma estufa a -57°C por 10 min, posteriormente foram mergulhados duas vezes em água destilada para remoção do OCT (Tissue Tek). Então foram imersos na Hematoxilina por 3 minutos, novamente em água destilada e, em seguida, em Eosina por 2 minutos. Por fim, foram

desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80% e 90%, por 1 minuto cada e 100%, por duas vezes de 1 minuto). Para a diferenciação, os cortes foram mergulhados em Xilol por duas vezes de 1 minuto cada. A coloração foi realizada em cada um dos 4 cortes e foi visualizada por microscopia óptica.

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para calcular o tamanho da amostra, utilizamos as seguintes informações:

- Número de grupos - número de populações sendo comparadas;
- Desvio padrão estimado e menor diferença a ser detectada - para a estimativa do desvio padrão e da menor diferença a ser detectada foram considerados trabalhos anteriores do grupo que realizaram testes e análises similares às utilizadas neste trabalho (CARDOSO et al., 2019);
- Nível de significância (α) - utilizamos o mais usual que é uma significância de 5%;
- Poder da amostra ($1-\beta$) - foi utilizado o mais usual que é um poder de 80%.

Como resultado, obtivemos um $n = 3$.

Este estudo também segue os princípios éticos dos 3Rs (Substituição do inglês “*Replacement*”, Redução do inglês “*Reduction*”, e Aprimoramento do inglês “*Refinement*”), buscando minimizar o número de animais utilizados e reduzir o sofrimento animal.

Para análise estatística, os resultados obtidos foram analisados através do GraphPad Prism 9 (GraphPad Inc.) e foram apresentados em forma de média e \pm erro padrão da média (SEM, do inglês “*Standard Error of the Mean*”). Para análise dos dados, como foram analisados 3 ou mais grupos, foi utilizada a análise de variância ANOVA one-way, com um teste de comparações múltiplas post hoc de Tukey, para as análises paramétricas e o Teste de Kruskal Wallis, para as não-paramétricas. Todos os resultados foram apresentados como média \pm SEM e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. ÍNDICE DE FUNÇÃO DO ISQUIÁTICO

Para avaliar a recuperação da função motora em animais lesionados, utilizamos IFI ($n = 4$). O IFI é avaliado por meio da marcação e medição das patas dos animais, e os resultados são analisados de acordo com a fórmula estabelecida por INSERRA, BLOCH e TERRIS (1998). Na figura 11-A, podemos perceber os padrões de pegadas obtidos no teste para as semanas 0 (pré-lesão), 1 (logo após a lesão) e 8

(final da sobrevida). Na quantificação, os resultados demonstram que, na sexta semana, os animais do grupo Inosina + Exercício ($-67,544 \pm 3,849$) apresentaram um melhor índice no teste quando comparado ao grupo Salina ($-97,619 \pm 1,833$; $p = 0,0003$) e ao grupo Inosina ($-88,088 \pm 1,552$; $p = 0,0088$), enquanto que o grupo Salina + Exercício ($-76,915 \pm 4,217$) teve melhores resultados em relação ao grupo Salina ($-97,619 \pm 1,833$; $p = 0,0036$). Na sétima semana os resultados se mantêm para os grupos Inosina + Exercício ($-77,640 \pm 0,779$; $p = 0,0137$) e Salina + Exercício ($-77,827 \pm 5,877$; $p = 0,0108$) quando comparados ao Salina ($-101,556 \pm 0,813$). Ao final da sobrevida, o grupo Inosina + Exercício ($-71,252 \pm 3,782$) mantém melhores resultados quando comparado ao grupo Salina ($-92,549 \pm 5,191$; $p=0,476$) (Figura 11, B). Este resultado sugere que os animais do grupo Inosina + Exercício mantiveram um melhor IFI quando comparados ao grupo Salina, sugerindo que esse grupo possui uma melhor qualidade de marcha.

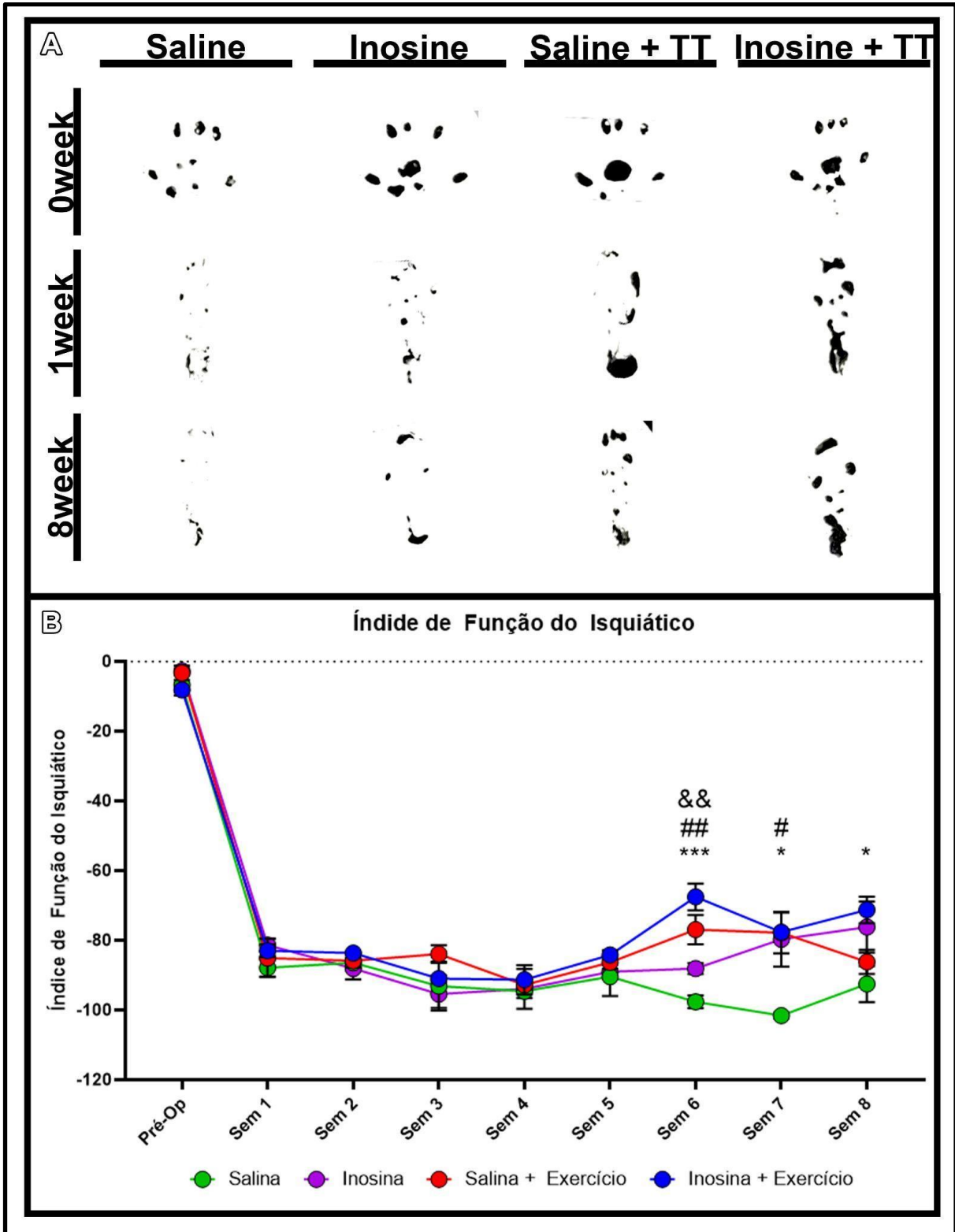


Figura 11. Índice de Função do Isquiático. **A.** Impressão da pata dos animais dos quatro grupos na semana 0 (pré-lesão), 1 (pós-lesão) e 8 (final da sobrevivência). **B.** Resultados do IFI ao longo das 8 semanas. Observe que a partir da 6ª semana, os animais dos grupos exercício (azul e vermelho) apresentaram um índice mais elevado quando comparado ao grupo salina (verde) e o exercício combinado com inosina obteve melhores resultados ao grupo inosina (Roxo). O resultado dos grupos exercício se mantém em relação ao salina na sétima semana. Já na oitava semana, somente o grupo Inosina + Exercício possui um melhor índice quando comparado ao salina. Para o IFI: $n = 4$. Dados apresentados em média \pm SEM. (*Inosina + Exercício x Salina, # Salina + Exercício x Salina e & Inosina + Exercício x Inosina). (*, # para $p < 0,05$; ##, && para $p < 0,005$ e *** para $p < 0,0005$).

4.2. TESTE DA PICADA DO ALFINETE (PIN PRICK TEST)

Para avaliação da sensibilidade dolorosa cutânea, utilizamos o teste da picada do alfinete ($n = 4$). Com os resultados obtidos é possível observar que na oitava semana após a lesão por transecção, os grupos Inosina + Exercício ($4 \pm 0,408$, $p=0,0072$), Salina + Exercício ($4,25 \pm 0,25$, $p=0,0072$) e Inosina ($4,5 \pm 0,289$, $p=0,0023$) obtiveram melhores pontuações quando comparados ao grupo salina ($2,75 \pm 0,25$), mostrando uma recuperação mais avançada da sensibilidade dolorosa cutânea, com diferença estatisticamente significante, $p=0,0381$ (Figura 12). Este resultado sugere uma possível antecipação na regeneração de fibras sensitivas dos animais dos grupos que receberam alguma intervenção quando comparados ao grupo salina.

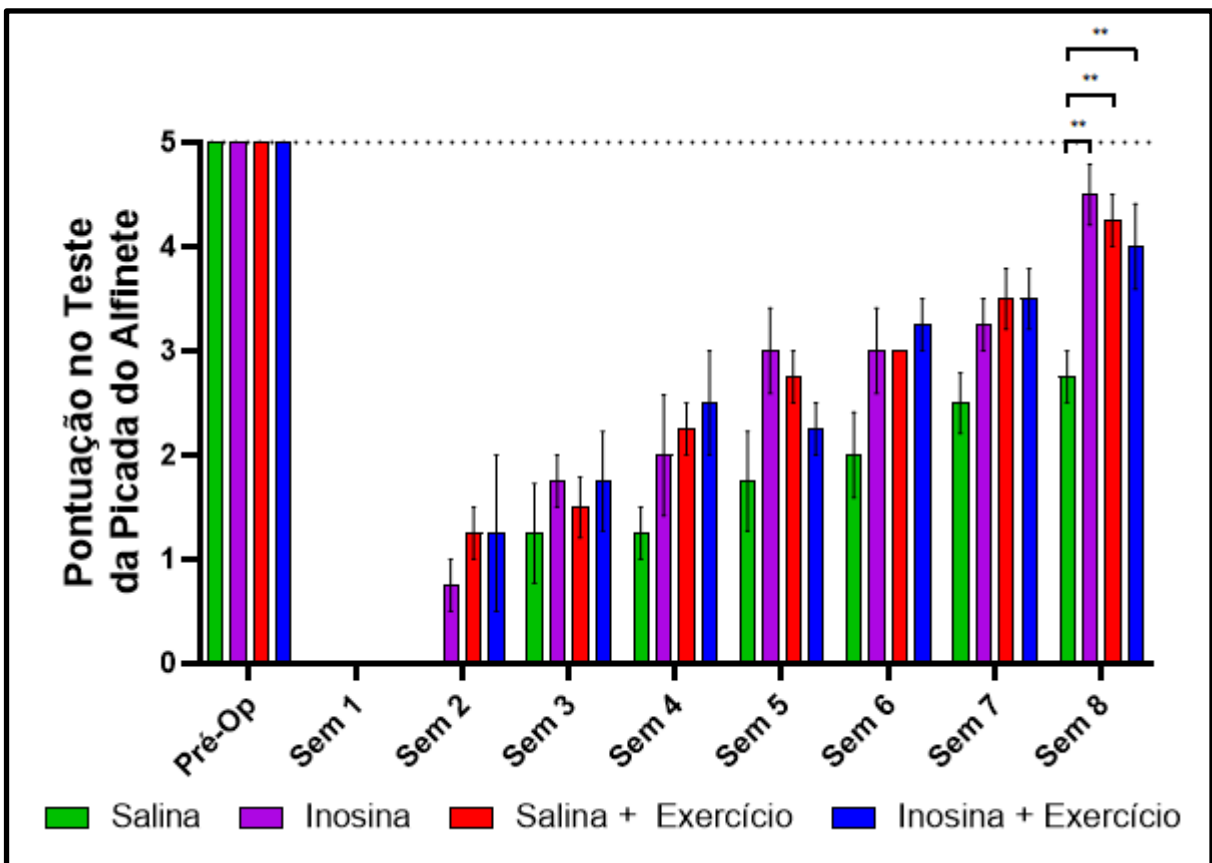


Figura 12. Teste da Picada do Alfinete. Gráfico apresentando os resultados obtidos no teste da picada do alfinete. Observem que para este teste, os animais dos grupos Inosina + Exercício (azul), Salina + Exercício (vermelho) e Inosina (roxo) apresentam uma maior pontuação no teste quando comparados ao grupo salina (verde). Para o teste da picada do alfinete: $n = 4$. Dados apresentados em média \pm SEM. ($p < 0,005$).

4.3. TESTE DE PRESSÃO CRESCENTE NA PATA (ANALGESÍMETRO DIGITAL-VON FREY ELETRÔNICO)

Para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, utilizamos o teste de pressão crescente na pata ($n = 4$). Com os resultados obtidos é possível observar

que já na segunda semana os animais do grupo Salina + Exercício ($1,642 \pm 0,124$) apresentaram resposta a um menor estímulo quando comparados aos grupos inosina ($2,492 \pm 0,136$; $p = 0,0091$) e salina ($2,233 \pm 0,162$; $p = 0,0246$). Na quarta semana após a transecção, os animais submetidos ao protocolo de exercício em esteira, grupos Inosina + Exercício ($1,233 \pm 0,091$) e Salina + Exercício ($1,233 \pm 0,152$), apresentaram resposta a menores pressões quando comparados aos grupos que não foram submetidos ao mesmo protocolo, grupos Inosina ($2,050 \pm 0,050$; $p < 0,005$) e Salina ($1,825 \pm 0,098$; $p < 0,0005$). Na quinta semana o resultado se mantém para o grupo Inosina + Exercício ($0,755 \pm 0,103$) em relação ao Salina ($1,608 \pm 0,222$; $p = 0,0056$). Na sexta semana, os grupos Inosina + Exercício ($0,833 \pm 0,038$), Salina + Exercício ($0,950 \pm 0,065$) e Inosina ($0,972 \pm 0,120$) apresentaram resposta a menores estímulos quando comparados ao grupo salina ($1,633 \pm 0,129$; $p < 0,0005$). Enquanto que na sétima semana os resultados se mantêm apenas para os grupos submetidos ao exercício, grupo Inosina + Exercício ($0,650 \pm 0,073$) e Salina + Exercício ($0,683 \pm 0,102$) quando comparados ao Salina ($1,108 \pm 0,044$; $p < 0,05$) (Figura 13). Este resultado sugere de forma mais evidente uma possível antecipação na regeneração de fibras sensitivas dos grupos submetidos ao protocolo de exercício em esteira quando comparados ao grupo salina.

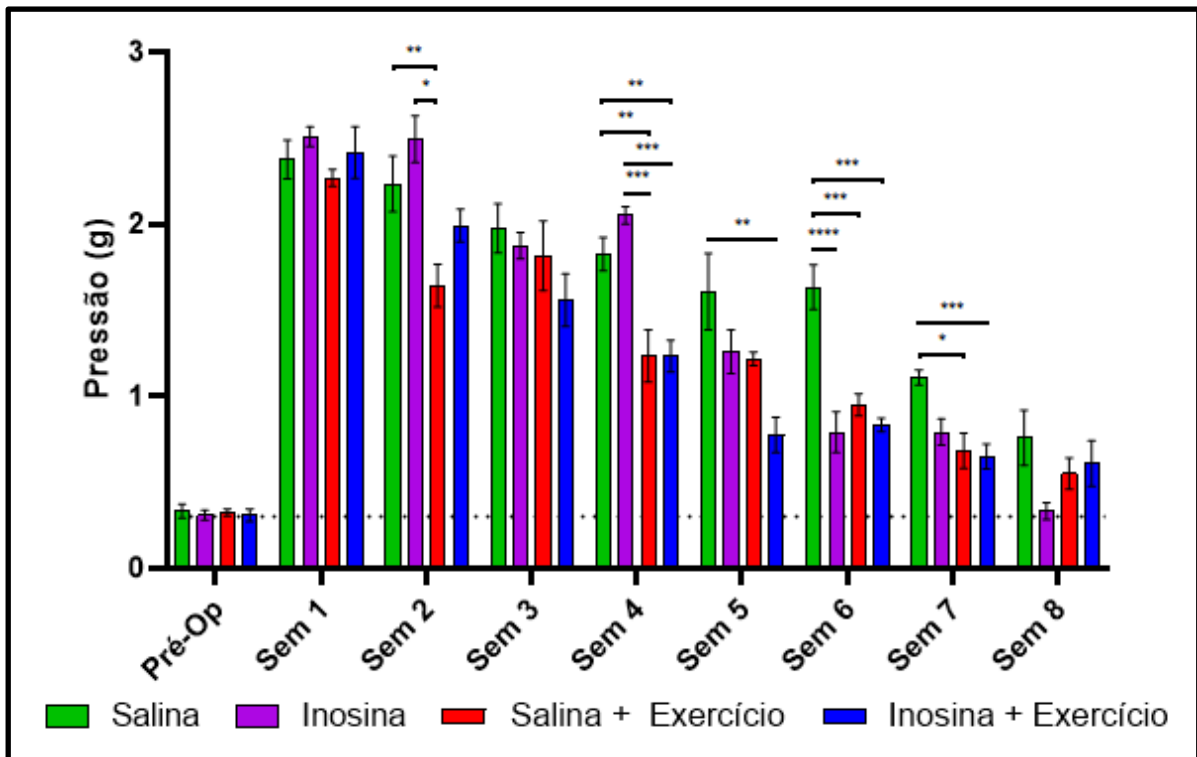


Figura 13. Teste de Pressão Crescente na Pata. Gráfico apresentando os resultados obtidos no teste de pressão crescente na pata. Observem que para este teste, os animais dos grupos submetidos ao protocolo de exercício em esteira (azul e vermelho) apresentaram resposta a um menor estímulo quando comparados ao grupo inosina e ao grupo salina, na quarta semana após a lesão. Na sexta semana o resultado se repete e o Inosina (Roxo) também apresenta resposta a um menor estímulo quando comparado ao grupo Salina (Verde). Já na sétima semana somente os animais dos grupos submetidos ao exercício apresentam resposta a menores pressões quando comparados ao salina. Para o teste de pressão crescente na pata: $n = 4$. Dados apresentados em média \pm SEM. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

4.4. ELETROFISIOLOGIA

Para analisar a regeneração axonal a partir do PAMC após lesão por transecção e tubulização do nervo isquiático, realizamos a eletroneuromiografia ($n = 3$) (figura 14). Ao realizarmos a quantificação dos traçados, foi possível perceber que os grupos Inosina + Exercício ($1,0007 \pm 0,000033$), Salina + Exercício ($1,0007 \pm 0,000019$) e Inosina ($1,0007 \pm 0,000044$) não tiveram diferença significativa em suas latências quando comparados ao grupo sem lesão ($1,0007 \pm 0,000057$). Já o grupo salina ($1,0009 \pm 0,000011$) apresentou maior latência que os demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 14, B). Também foi possível observar que, em relação às amplitudes, os grupos inosina + exercício ($12,95 \pm 0,35$; $p < 0,05$) e o inosina ($15,87 \pm 0,74$; $p < 0,0005$), apresentaram maior amplitude quando comparados ao grupo salina ($7,15 \pm 0,86$), assim como o grupo controle sem lesão ($13,31 \pm 0,21$; $p < 0,005$), os grupos tratados com inosina e inosina + exercício têm amplitudes semelhantes ao grupo sem lesão, não apresentando diferença significativa. (Figura 14, C). Por fim, em relação à velocidade de condução nervosa, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 14, D).

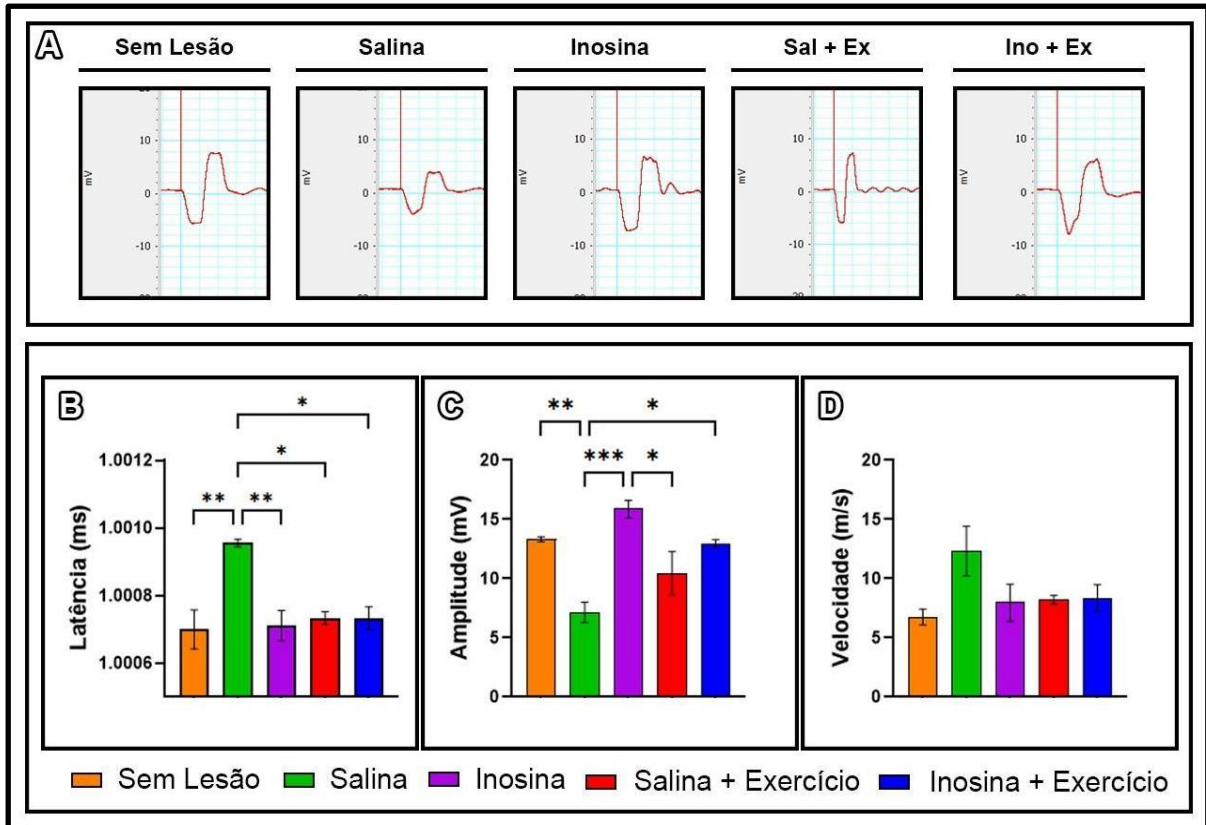


Figura 14. Eletrofisiologia. **A.** Traçado do potencial de ação muscular composto dos grupos sem lesão (laranja), inosina + exercício (azul), salina + exercício (vermelho), Inosina (rosa) e Salina (verde). **B-D.** Gráficos apresentando a latência, amplitude e a velocidade de condução do PAMC dos 5 grupos. **B.** Note que o grupo Salina possui uma maior latência ao compararmos com os demais grupos ($p < 0,05$), **C.** O grupo inosina + exercício e o inosina apresentaram uma maior amplitude quando comparados ao grupo salina ($p < 0,05$). O grupo inosina também teve uma maior amplitude em relação ao grupo salina + exercício ($p < 0,05$). **D.** Não houve diferença significativa entre as velocidades de condução nervosa dos 5 grupos. Para a eletrofisiologia: $n = 3$. Dados apresentados em média \pm SEM. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$).

4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Inicialmente realizamos uma análise qualitativa da parede do tubo de PLA. Em um primeiro momento, observamos um corte transversal da órtese de PLA utilizada no processo de reparo por tubulização do nervo isquiático dos 4 grupos (Figura 15, A). Em seguida, observamos o aspecto trabecular das paredes do tubo em maiores aumentos (Figura 15, B-C). Por fim, observamos o aspecto poroso da órtese, numa imagem de maior magnificação de uma trabécula (Figura 15, D), indicando que a órtese é permeável, possibilitando a interação da região interna da órtese com o ambiente externo.

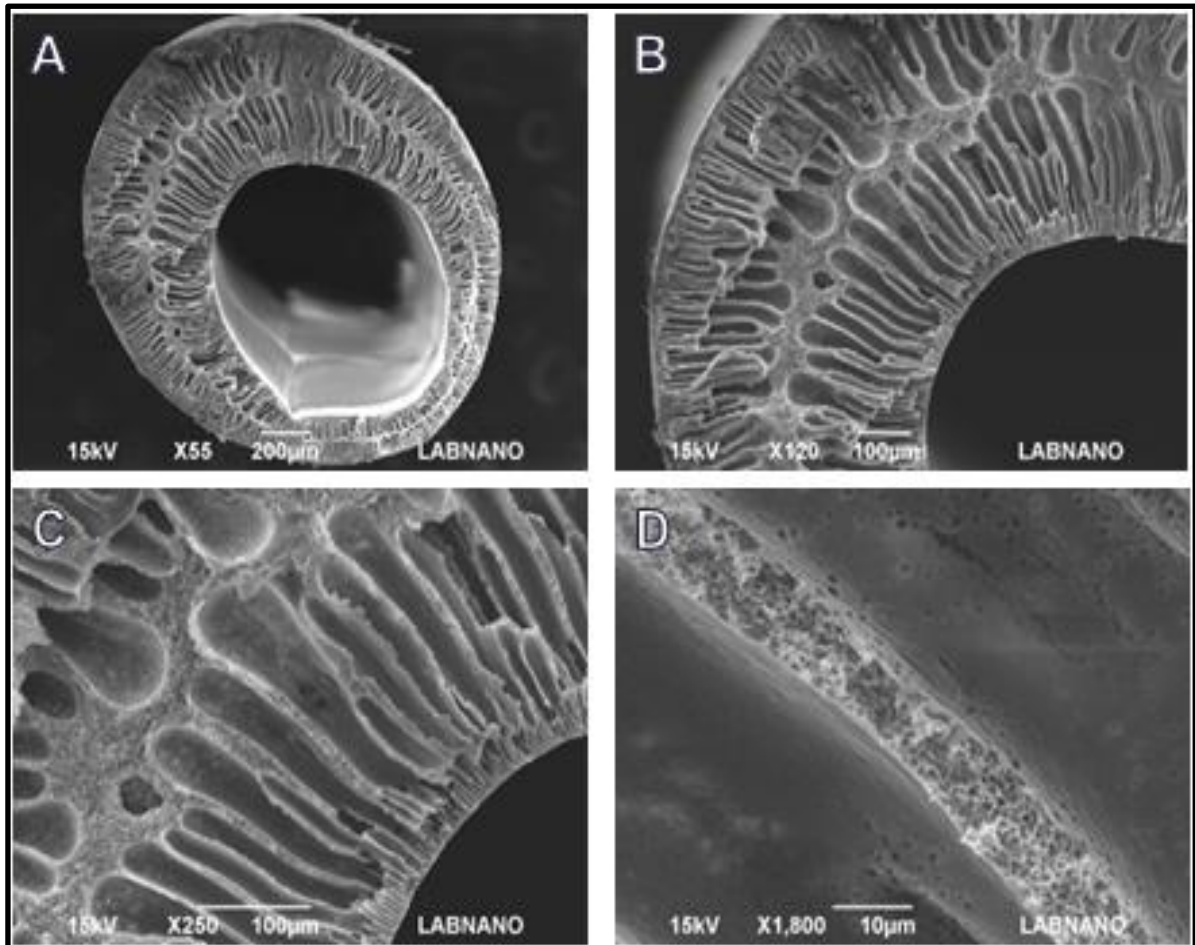


Figura 15. Microscopia Eletrônica de Varredura da órtese tubular de PLA. **A.** Corte transversal do tubo de PLA utilizado na tubulização do nervo isquiático dos 4 grupos. **B-C.** Paredes do tubo em maior aumento, onde é possível observar o aspecto trabecular do tubo. **D.** Trabécula do tubo em maior aumento, onde observamos o aspecto poroso do tubo.

A análise por MEV mostrou que, após oito semanas, todos os grupos apresentaram o nervo regenerado no interior das órteses tubulares (Figura 16, A-H). Também foi possível perceber que os grupos que receberam intervenção com inosina (Figura 16, B e F) e/ou exercício (Figura 16, C-D e G-H) apresentaram nervos mais espessos quando comparados ao grupo salina (Figura 16, A e E).

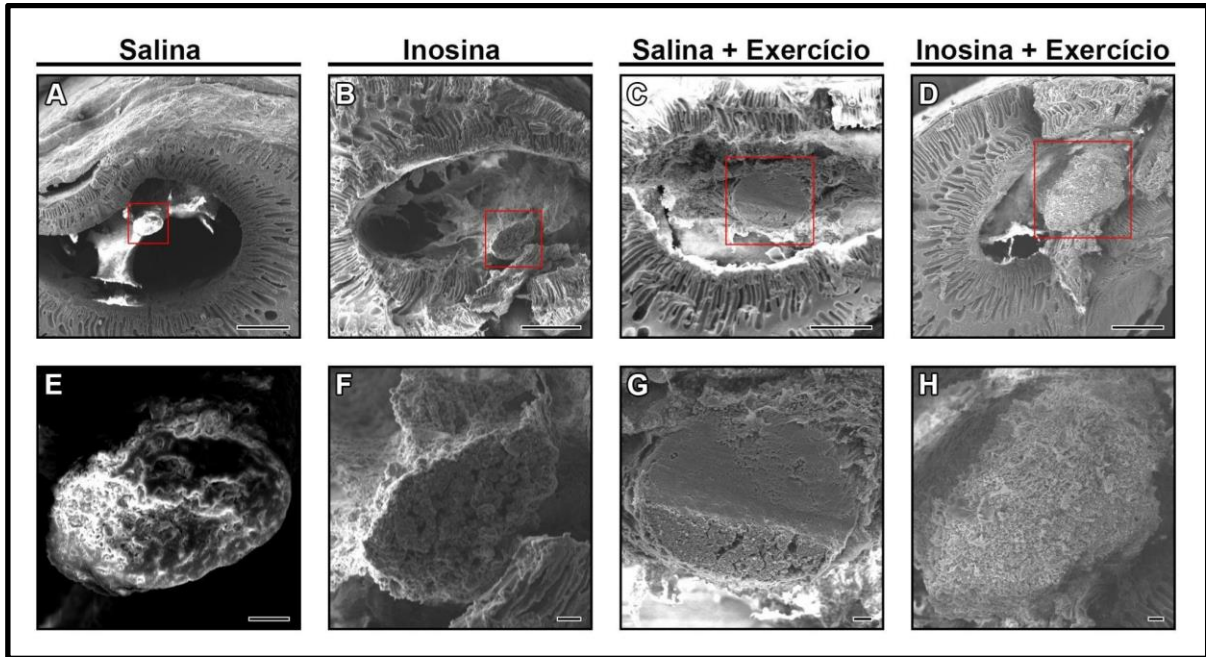


Figura 16. Microscopia Eletrônica de Varredura das órteses tubulares e os nervos em seu interior. A-H. Cortes transversais das órteses tubulares e nervos dos quatro grupos. A, E. Salina, B, F. Inosina, C, G. Salina + Exercício, D, H. Inosina + Exercício. Barra de escala 200 μ m (A-D) e 20 μ m (E-H).

4.6. MORFOLOGIA E MORFOMETRIA

Após oito semanas de sobrevida, os nervos foram processados, e foram realizadas as análises morfométricas no segmento B, com finalidade de avaliar o microambiente e a regeneração axonal após lesão por transecção e tubulização do nervo isquiático ($n = 3$). Nas figuras 17 e 18 podemos observar cortes semifinos (Figura 17, A-H) e ultrafinos (Figura 18, A-D) dos grupos Salina, Inosina, Salina + Exercício e Inosina + Exercício. A partir destas imagens, podemos observar o microambiente e organização tecidual dos segmentos B dos nervos isquiáticos em regeneração. Através da análise qualitativa dos cortes semifinos e ultrafinos é possível observar uma melhor organização tecidual, os fascículos nervosos encontram-se mais organizados e uma presença marcante de fibras mielínicas nos grupos nos quais os animais foram submetidos ao protocolo de exercício em esteira e/ou ao tratamento com inosina, sendo confirmados tais resultados nas análises morfométricas.

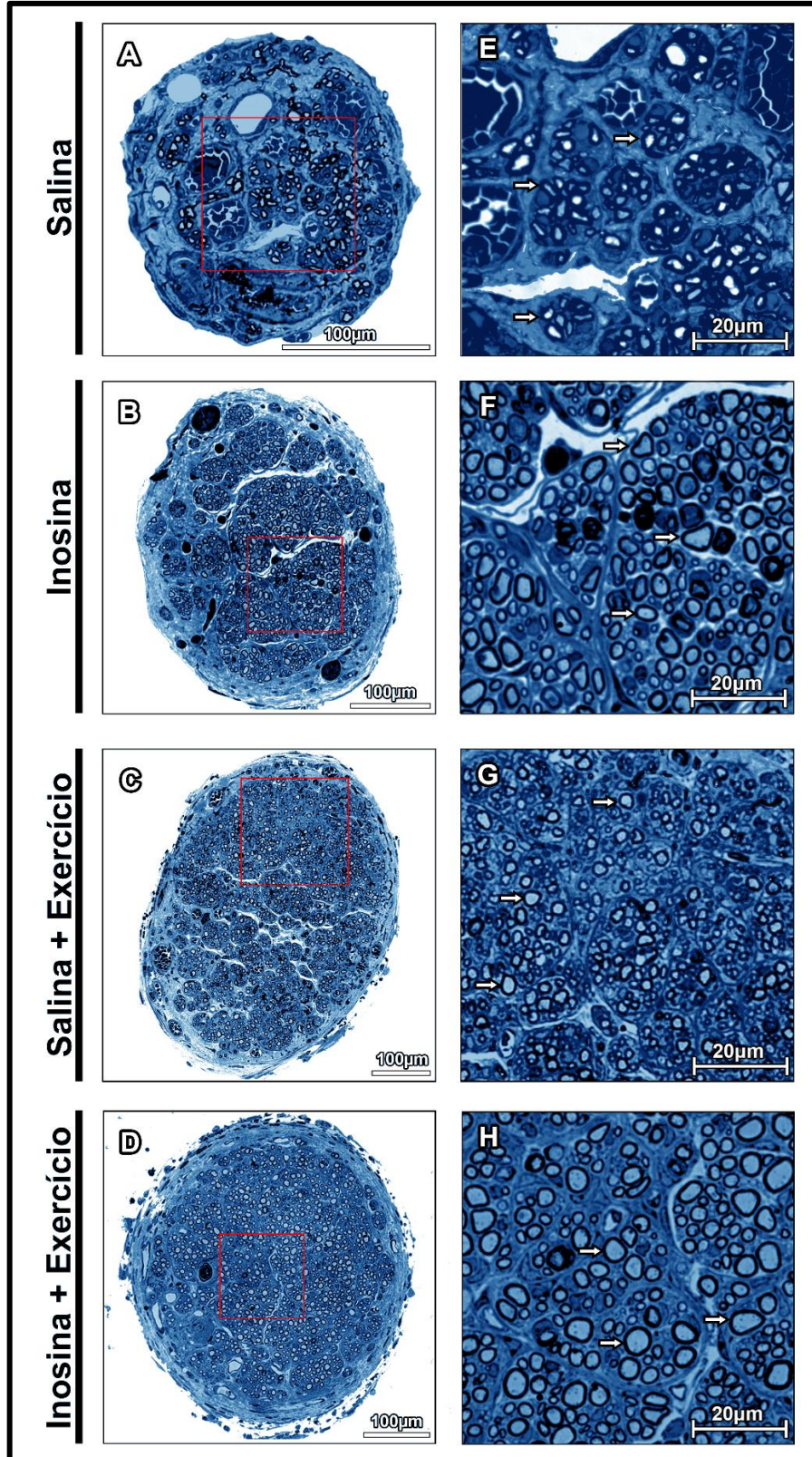


Figura 17. Morfologia dos nervos em regeneração. A-H. Cortes semi-finos dos segmentos B dos nervos isquiáticos dos animais dos 4 grupos. Os nervos dos grupos que receberam o tratamento com inosina, exercício e tratamento combinado (B-D) possuem uma maior área total e um maior número de fibras mielínicas (stas brancas) quando comparados ao grupo salina (A). Barra de escala = 100 μ m. Ainda podemos observar em uma maior magnificação (E-H) que os grupos que receberam tratamento (F-H), aparentam ter um ambiente mais organizado quando comparados ao grupo salina (E). Barra de escala = 20 μ m.

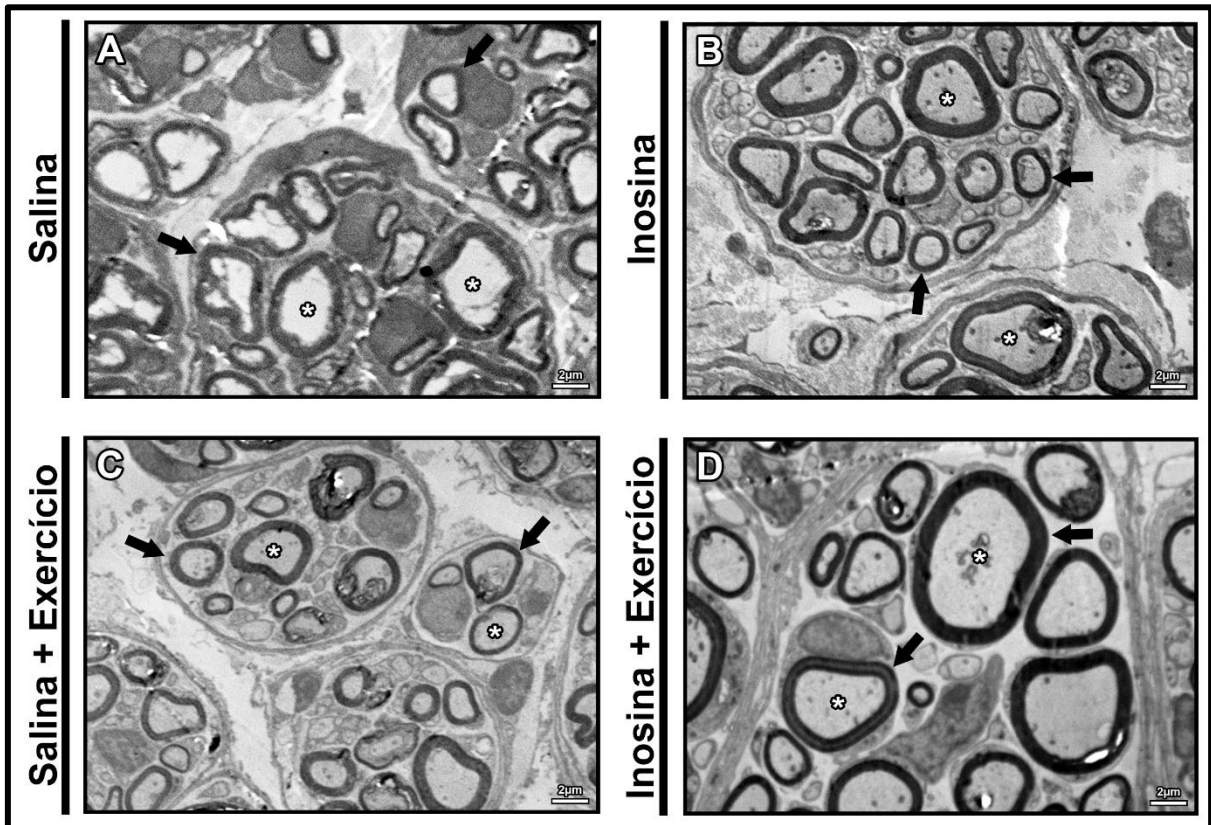


Figura 18. Ultraestrutura dos nervos em regeneração. Cortes ultrafinos do segmento B dos nervos isquiáticos dos animais dos 4 grupos. Os grupos que receberam tratamento com inosina, exercício e tratamento combinado (B, C e D) aparentam ter mais fibras mielínicas (setas pretas), quando comparados ao grupo salina. Além disso, o grupo Inosina + Exercício (D) aparenta ter maiores axônios (asterisco) quando comparados aos demais grupos (A, B e C). Barra de escala = 2 μ m.

A análise morfométrica corrobora o que foi visualizado na morfologia, onde os grupos Inosina + Exercício ($1.442,00 \pm 22,50$), Salina + Exercício ($1.320,00 \pm 96,00$) e Inosina ($1.133,00 \pm 182,50$) apresentaram um maior número de fibras mielínicas quando comparados ao grupo Salina ($328,00 \pm 56,71$; $p < 0,05$) (Figura 19, A). Não foi observada diferença significativa em relação ao número de vasos sanguíneos (Figura 19, B). Ao avaliarmos as áreas dos axônios, de mielina e das fibras mielínicas (Figura 19, C-E), constatamos que para valores da área do axônio (Figura 19, C), área de mielina (Figura 19, D) e área da fibra (Figura 19, E), o grupo Inosina + Exercício ($4,657 \pm 0,559$; $3,456 \pm 0,796$ e $9,010 \pm 0,952$) apresentou maiores áreas quando comparados ao grupo Salina ($2,50 \pm 0,115$; $1,115 \pm 0,106$ e $5,576 \pm 0,484$; $p < 0,05$).

A análise da Razão G demonstrou que os segmentos B dos nervos isquiáticos em regeneração dos animais que receberam Inosina ($51,55 \pm 3,224$; $p = 0,0072$), Salina + Exercício ($48,97 \pm 3,545$; $p = 0,0170$) e Inosina + Exercício ($47,14 \pm 1,392$; $p = 0,0321$) apresentaram um maior percentual de fibras mielínicas dentro da faixa de 0,55 à 0,68, descrita por Chomiak e Hu (2009) como mais eficiente. Assim como na faixa imediatamente acima, de 0,69-0,82, temos o grupo Inosina ($21,63,0 \pm 5,017$; $p = 0,0217$) e Inosina + Exercício ($30,26 \pm 3,311$; $p = 0,$) com um maior percentual de fibras nesta faixa quando comparados ao grupo Salina ($4,47 \pm 2,070$). Ainda, o grupo Inosina + Exercício apresentou maior percentual de fibras mielínicas dentro desta faixa quando comparado ao grupo Salina + Exercício ($13,01 \pm 0,4759$; $p = 0,0020$) (Figura 19, F). Além disso, nas duas faixas abaixo da preconizada por Chomiak e Hu (2009), obtivemos diferenças significativas entre os grupos tratados com inosina e exercício quando comparados ao grupo salina ($p < 0,05$). Quando analisamos as médias das razões G de cada grupo, observamos que os grupo inosina + exercício ($0,62 \pm 0,01$, $p = 0,0103$) e inosina ($0,6033 \pm 0,0088$, $p = 0,0319$) apresentam média e medidas de dispersão dentro da faixa descrita como mais eficiente, enquanto o grupo salina ($0,5333 \pm 0,0240$) tem sua média fora da faixa preconizada (Figura 19, G). Relação entre as Razões G e os diâmetros dos axônios dos grupos Salina (Figura 19, H), Inosina (Figura 19, I), Salina + Exercício (Figura 19, J), Inosina + Exercício (Figura 19, K).

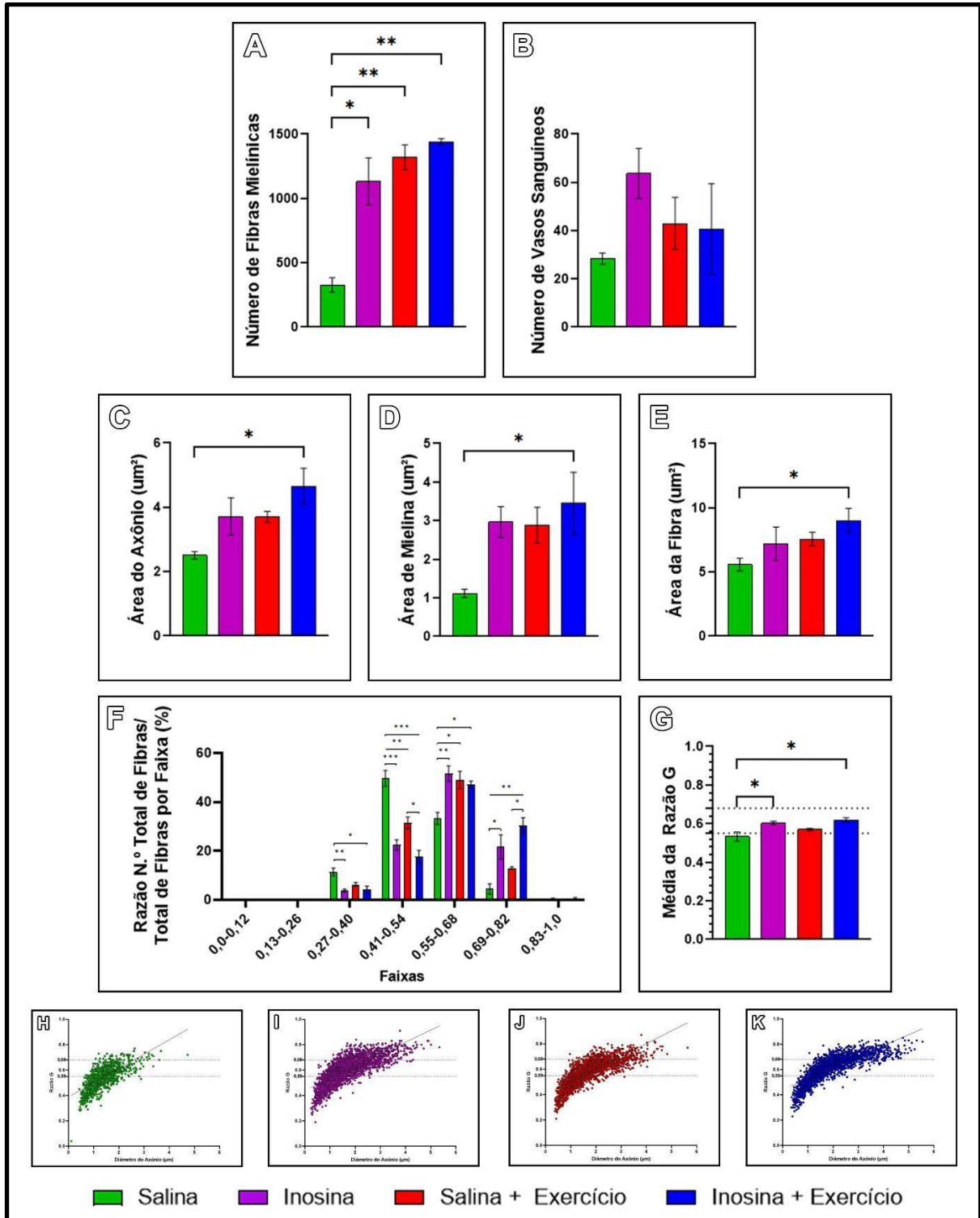


Figura 19. Morfometria dos nervos em regeneração. **A.** Número de fibras mielínicas. **B.** Número de vasos sanguíneos. **C.** Área dos axônios (μm^2). **D.** Área de mielina (μm^2). **E.** Área das fibras mielínicas (μm^2). As áreas dos axônios, de mielina e das fibras do grupo inosina + exercício são maiores que as do grupo salina de forma estatisticamente significativa. **F.** Razão G dos segmentos B do nervo isquiático em regeneração distribuído em faixas. Os grupos que receberam tratamento com inosina, isolado e combinado com exercício apresentaram uma maior porcentagem de fibras mielínicas na faixa preconizada por Chomiak e Hu (2009). **G.** Média da Razão G dos segmentos B do nervo isquiático em regeneração, demonstrando que os animais dos grupos inosina + exercício e do grupo inosina, obtiveram médias dentro da faixa descrita por Chomiak e Hu (2009), enquanto o grupo salina fica, em média, abaixo dessa faixa com resultado estatisticamente significativo. **H-K.** Relação entre as Razões G e os diâmetros dos axônios (μm) dos grupos Salina (H), Inosina (I), Salina + Exercício (J), Inosina +

Exercício (K). Para as análises morfométricas: $n = 3$. Dados apresentados em média \pm SEM. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$).

4.7. ANÁLISE DE NEUROFILAMENTOS E RECEPTORES PURINÉRGICOS

Para avaliar a presença e distribuição de axônios nos nervos isquiáticos dos animais dos quatro grupos, foi realizada uma IHQ para NF200 e posteriormente a quantificação da área de marcação ($n = 3$). Podemos observar que os cortes transversais dos nervos isquiáticos dos animais que receberam as intervenções com inosina e/ou exercício (inosina, salina + exercício e inosina + exercício) aparentam ter uma marcação mais intensa para essa proteína quando comparados ao grupo salina (Figura 20).

A quantificação da área relativa imunomarcada nos nervos isquiáticos mostrou diferença significativa entre os grupos inosina, salina + exercício e inosina + exercício ($42,70 \pm 1,271$; $p = 0,0464$; $42,25 \pm 2,181$; $p = 0,0095$; $53,69 \pm 2,000$; $p < 0,0001$, respectivamente) quando comparados ao grupo salina ($26,64 \pm 0,0003409$), em relação à porcentagem da área de fluorescência para NF200 (Figura 20, E). Além disso, o grupo que recebeu as terapias combinadas apresentou maior porcentagem de área marcada quando comparado aos grupo inosina ($p = 0,0002$ e salina + exercício ($p = 0,0001$).

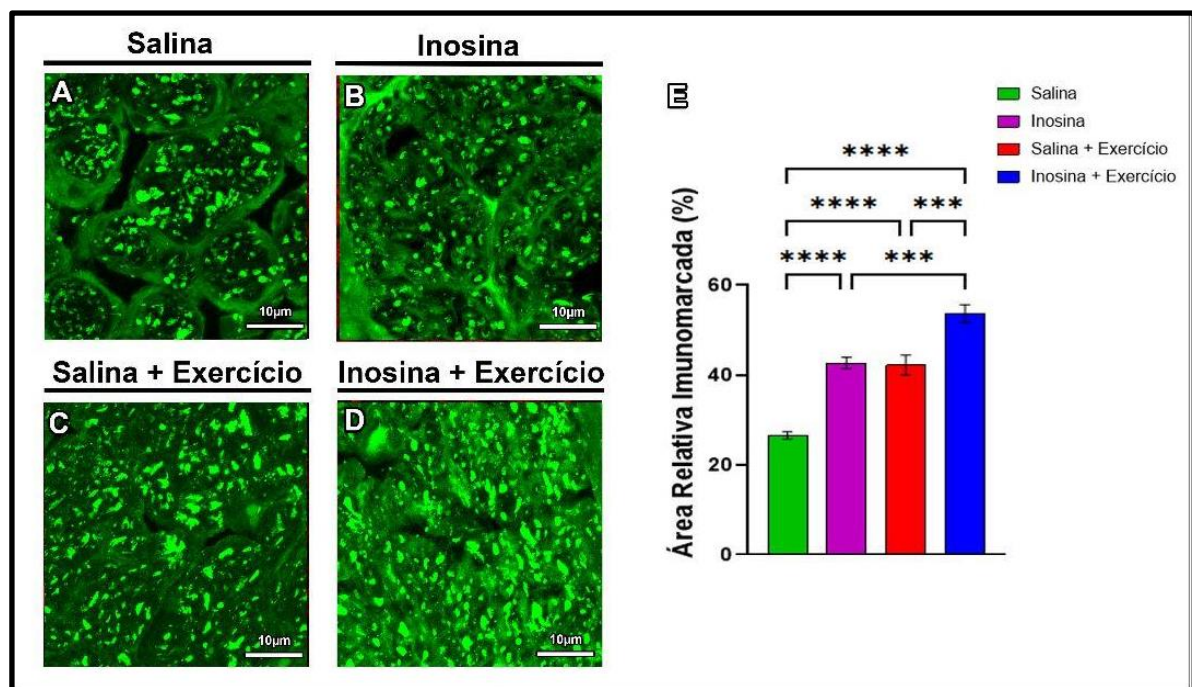


Figura 20. Análise da área relativa imunomarcada para NF-200. A-D. Observe as marcações do grupo salina (A) e, em maior intensidade nos grupos inosina (B), salina + exercício (C) e inosina + exercício (D). Barra: 10 μ m. **E.** Quantificação da área relativa imunomarcada para NF-200 (A-D). Para a análise da área imunomarcada para NF-200: $n = 3$. Dados apresentados em média \pm EP. (** $p < 0,0002$ e **** $p < 0,0001$).

Para avaliar a presença e localização dos receptores de adenosina A2A nos nervos isquiáticos dos animais dos quatro grupos, foi realizada uma IHQ para A2Ar e posteriormente a quantificação da área de marcação ($n = 3$). Podemos observar que os cortes transversais dos nervos isquiáticos dos animais que receberam as intervenções com inosina e/ou exercício (inosina, salina + exercício e inosina + exercício) aparentam ter uma marcação mais intensa para essa proteína quando comparados ao grupo salina (Figura 21).

A quantificação da área relativa imunomarcada (%) nos nervos isquiáticos mostrou diferença significativa entre os grupos inosina, salina + exercício e inosina + exercício ($35,23 \pm 1,185$; $37,50 \pm 1,439$; $36,98 \pm 2,794$; $p < 0,0001$, respectivamente) quando comparados ao grupo salina ($20,81 \pm 1,502$), em relação à porcentagem da área de fluorescência para A2Ar (Figura 21, E).

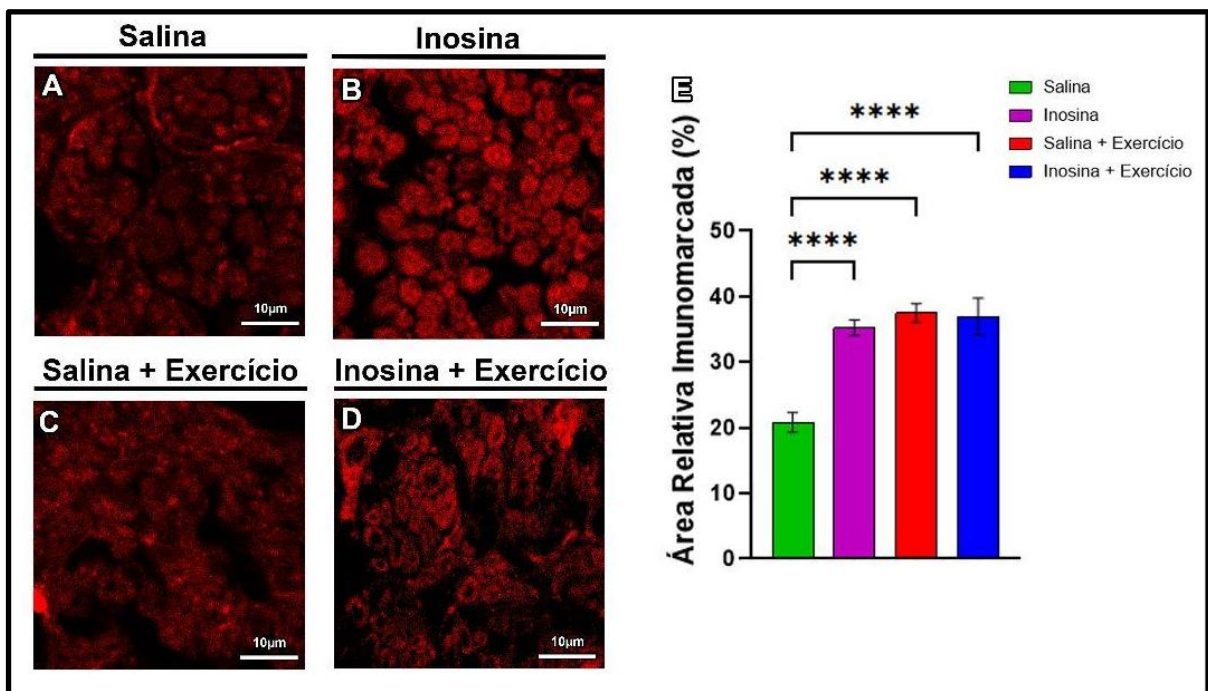


Figura 21. Análise da área relativa imunomarcada para A2Ar. A-D. Observe as marcações do grupo salina (A) e, em maior intensidade nos grupos inosina (B), salina + exercício (C) e inosina + exercício (D). Barra: 10 µm. **E.** Quantificação da área relativa imunomarcada para o receptor A2A (A-D). Para a análise da área imunomarcada para A2Ar: $n = 3$. Dados apresentados em média \pm EP. (**** $p < 0,0001$).

4.8. QUANTIFICAÇÃO DE CORPOS CELULARES DE MOTONEURÔNIOS E NEURÔNIOS SENSITIVOS

Para avaliar a capacidade neuroprotetora, ou seja, de aumentar a sobrevivência de células nervosas em animais submetidos a lesão por transecção e tubulização do nervo isquiático, 8 semanas após a lesão, realizamos a contagem dos

nucléolos dos neurônios sensitivos nos GRD ($n = 3$) (Figura 22, A-H) e dos motoneurônios no corno anterior da medula espinal ($n = 3$) (Figura 22, J-Q). Com os resultados obtidos, observamos que ao final da sobrevivência, os grupos que receberam as intervenções (inosina, salina + exercício e inosina + exercício) apresentaram um maior número de nucléolos evidentes de neurônios sensitivos ($46,67 \pm 0,882$; $50,00 \pm 3,464$; $60,33 \pm 5,044$) quando comparados aos animais do grupo salina ($28,00 \pm 4,359$). O mesmo é percebido ao analisarmos o número de motoneurônios, onde os animais dos grupos que receberam as intervenções (inosina, salina + exercício e inosina + exercício) apresentaram um maior número de nucléolos evidentes ($88,33 \pm 5,487$; $89,33 \pm 2,404$; $91,00 \pm 4,583$) quando comparados aos animais do grupo salina ($67,00 \pm 1,528$). Sendo essas diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,005$ nas comparações entre o grupo inosina + exercício e o grupo salina e $p < 0,05$ para as comparações entre os grupos inosina e salina + exercício e o grupo salina. Esses resultados nos permitem demonstrar que as intervenções propostas, com o uso da inosina e a realização de exercício em esteira, são capazes de promover uma maior sobrevivência de neurônios sensitivos e motores, 8 semanas após a lesão e reparo do nervo isquiático *in vivo*.

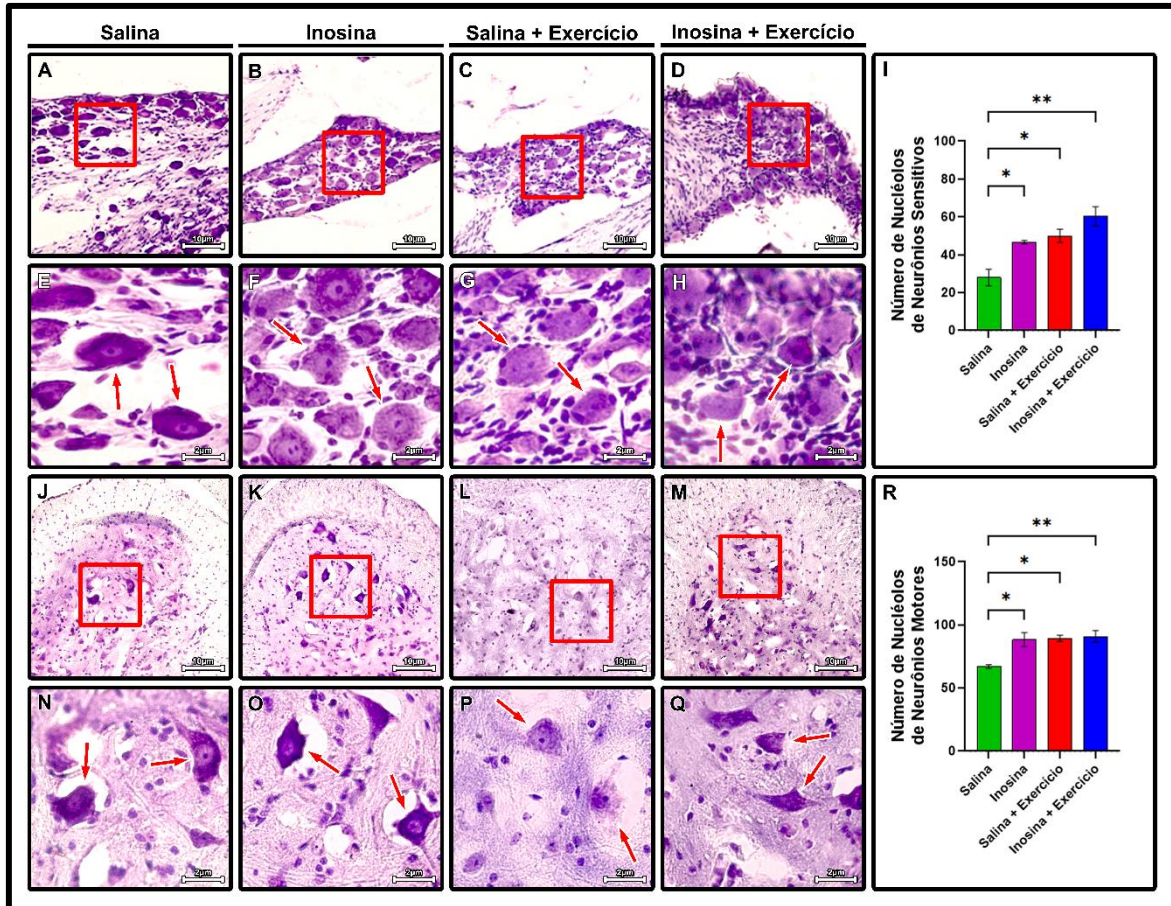


Figura 22. Quantificação de corpos celulares de motoneurônios e neurônios sensitivos. A-H. Cortes transversais de gânglios da raiz dorsal e J-Q. Cortes transversais de medulas, corados com cresil violeta a 0,5% em aumentos de 20x (A-D; J-M) e 63x (E-H; N-Q). A, E, J, N. grupo salina; B, F, K, O. grupo inosina; C, G, L, P. grupo salina + exercício; D, H, M, Q. grupo inosina + exercício. Neles podemos observar uma diferença significativa entre os grupos que receberam intervenção com inosina e/ou exercício, apresentando maiores quantidades de nucléolos e respectivamente um maior número de corpos de neurônios (setas vermelhas) sensitivos e motores como apresentado nos gráficos (I; R, respectivamente) quando comparados ao grupo salina. Para as análises quantitativas dos nucléolos evidentes de neurônios sensitivos e motores: n = 3. Setas representam Dados apresentados em média \pm SEM (* p < 0,05 e ** p < 0,005). Barra: 10 μ m (A-D; J-M) e 2 μ m (E-H; N-Q).

4.9. ANÁLISE DOS MÚSCULOS GASTROCNÊMIOS

Após 8 semanas, foram retirados os músculos gastrocnêmios lateral e medial, direito (intervenção) e esquerdo (controle) dos 4 grupos analisados (n = 3). Observou-se já de forma qualitativa que os animais dos grupos que foram submetidos ao protocolo de exercício apresentaram tanto no lado lesionado como no controle contralateral músculos mais volumosos do que aqueles que não foram submetidos ao protocolo em esteira motorizada (Figura 23, A). Ao quantificarmos os pesos secos de forma isolada, percebemos que o grupo inosina + exercício ($0,49 \pm 0,05$) apresentou um maior peso em gramas quando comparado aos grupos inosina ($0,42 \pm 0,04$; p < 0,05) e salina ($0,33 \pm 0,02$; p < 0,005) e o grupo salina + exercício ($0,46 \pm 0,002$) apresentou um maior peso quando comparado ao grupo salina ($0,33 \pm 0,02$; p < 0,05)

(Figura 23, B). Ao normalizarmos os pesos tendo como denominador o músculo contralateral, essa diferença se mantém apenas para o grupo inosina + exercício ($0,09 \pm 0,01$) em relação ao grupo salina ($0,05 \pm 0,005$; $p < 0,05$) (Figura 23, C). Para as análises dos músculos gastrocnêmios: $n = 3$. Dados apresentados em média \pm EP.

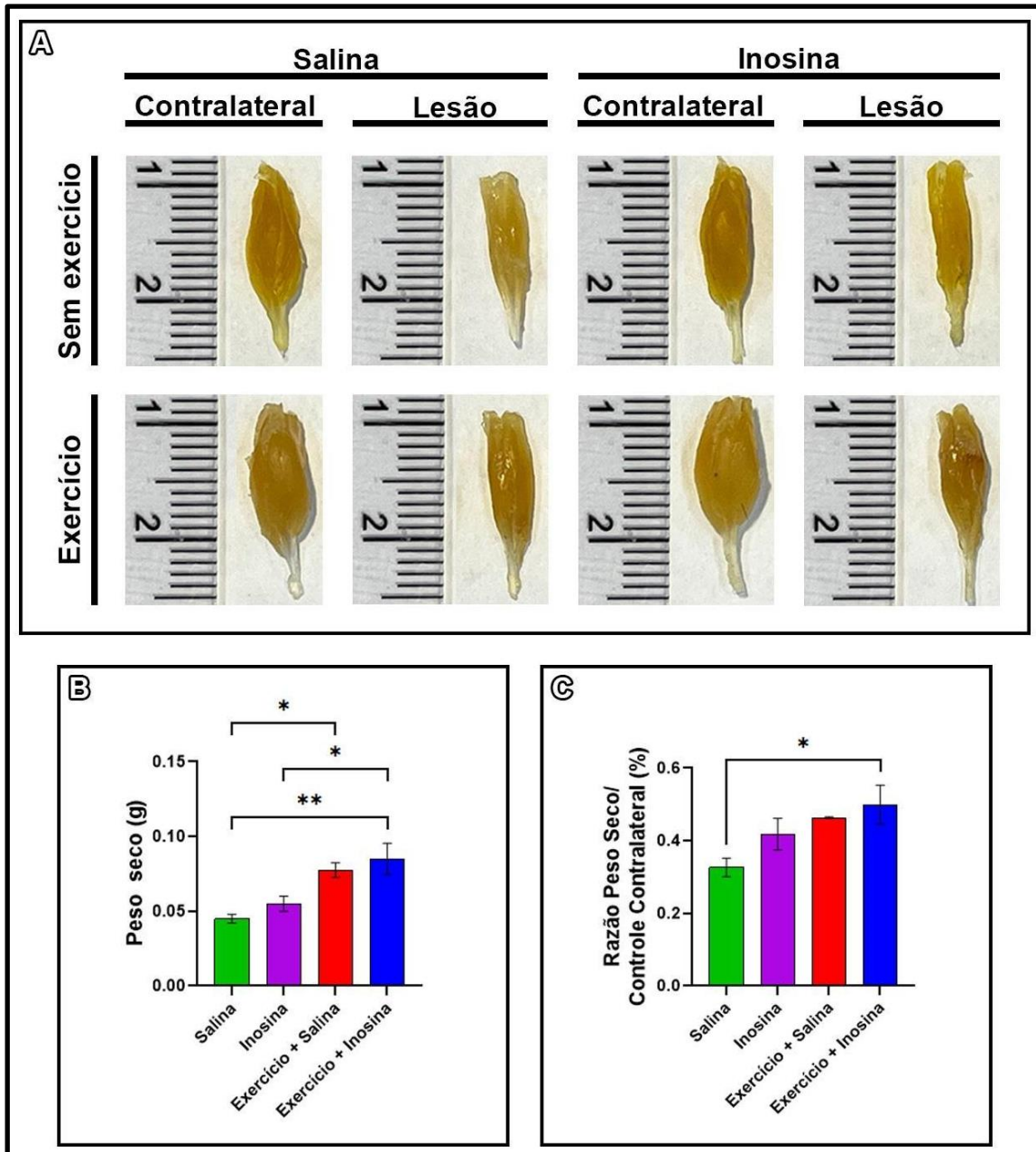


Figura 23. Análise dos músculos gastrocnêmios. **A.** Imagem dos músculos gastrocnêmios medial e lateral direitos (lesados) e esquerdos (controle sem lesão) dos 4 grupos. **B.** Peso seco em gramas dos músculos gastrocnêmios medial e lateral lesionados dos animais dos 4 grupos. **C.** Razão entre o peso seco dos músculos gastrocnêmios lesionados e o controle dos 4 grupos. Para as análises dos músculos gastrocnêmios: $n = 3$. Dados apresentados em média \pm EP (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$).

A análise histológica dos cortes transversais dos músculos gastrocnêmios corados com HE (Figura 24, A-D) permitiu avaliar as diferenças da morfologia dos quatro grupos experimentais, onde foi possível observar que os animais que foram

submetidos ao protocolo de exercício em esteira aparentavam ter mais fibras do que os animais dos grupos que não foram submetidos ao exercício. Ainda, que a área das fibras musculares dos grupos que receberam inosina e/ou exercício, aparentemente era maior do que a dos animais do grupo salina. A partir da quantificação (Figura 24, E-F), observamos que os achados qualitativos foram confirmados, onde os animais dos grupos inosina ($13,95 \pm 0,3152$, $p = 0,0004$), salina + exercício ($13,23 \pm 0,2979$, $p = 0,005$) e inosina + exercício ($13,24 \pm 0,3082$, $p = 0,0047$) apresentaram maiores áreas de fibra muscular, em μm^2 (Figura 24, E) quando comparados aos animais do grupo salina ($11,33 \pm 0,3277$). Além disso, os animais que foram submetidos ao protocolo de exercício em esteira (inosina + exercício, $624,0 \pm 12,86$, $p = 0,0007$; salina + exercício, $540,0 \pm 66,09$, $p = 0,0033$), apresentaram um maior número de fibras (Figura 24, F) quando comparados aos animais do grupo salina ($242,7 \pm 19,64$), resultado que também é visto ao compararmos o grupo inosina + exercício ao grupo inosina ($364,0 \pm 38,02$, $p = 0,0075$).

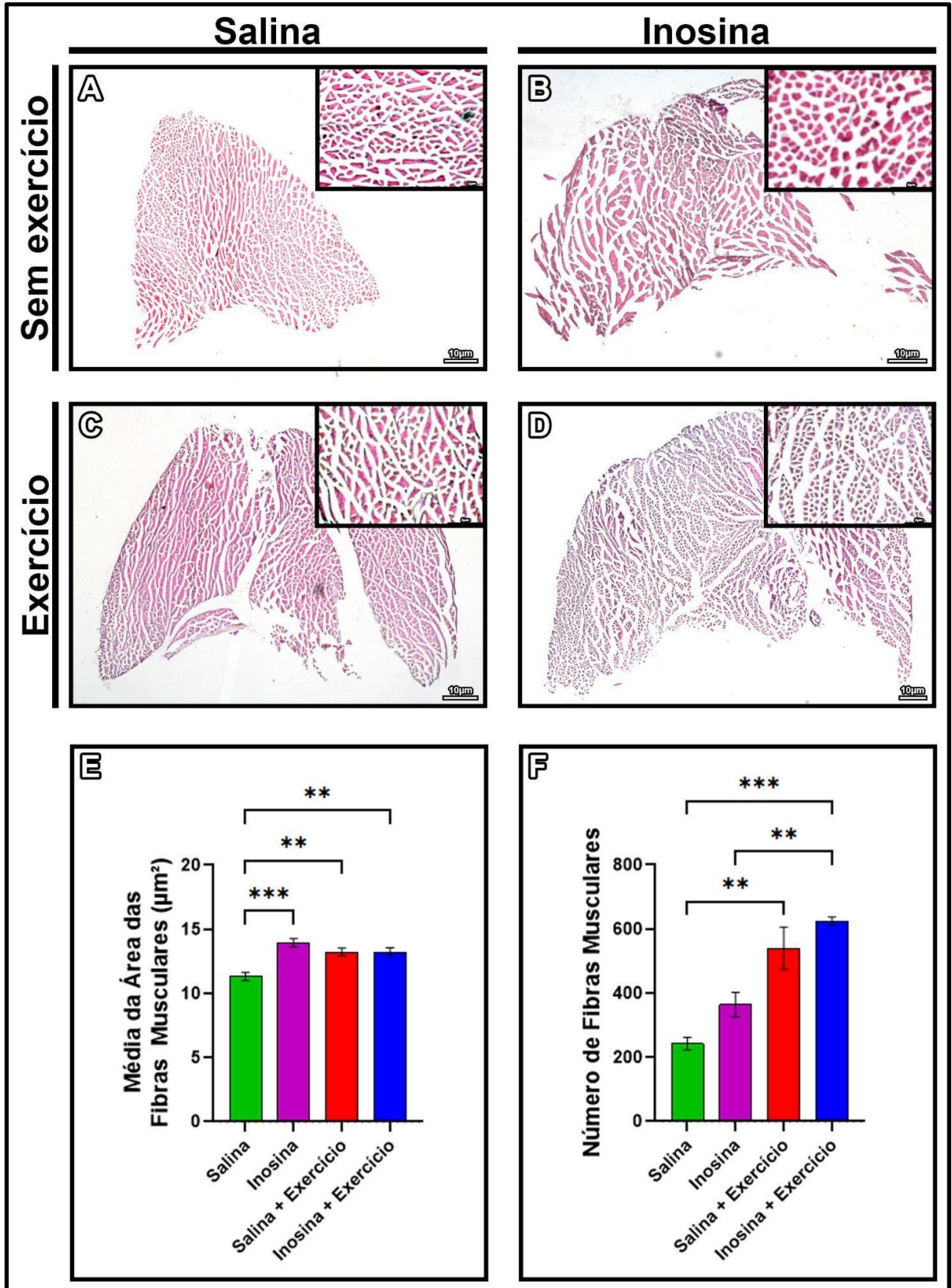


Figura 24. Análise morfológica dos músculos gastrocnêmios corados com HE. Cortes transversais do músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos **A.** Salina; **B.** Inosina; **C.** Salina + Exercício e **D.** Inosina + Exercício. **E.** Média da área das fibras musculares (μm^2). **F.** Número de fibras musculares. Barra: 10 μm . Para as análises morfológicas dos músculos gastrocnêmios: $n = 3$. Dados apresentados em média \pm SEM.

5. DISCUSSÃO

Muitos estudos destacam o potencial regenerativo do SNP, principalmente quando comparado ao SNC. Ainda que o SNP tenha uma maior plasticidade, restabelecer a funcionalidade prévia à LNP, sobretudo em lesões mais extensas, permanece como um grande desafio desde modelos experimentais até a translação para a clínica. Nos casos em que há perda tecidual importante, a recuperação da funcionalidade geralmente é parcial, evidenciando a importância de novos modelos e tratamentos que potencializam esta recuperação.

Alguns fatores são determinantes para o prognóstico do paciente após uma lesão de nervo periférico, como a idade, distância ao órgão alvo e a extensão e tipo de lesão. Estes fatores não são modificáveis e servem como parâmetros para o desenvolvimento de potenciais modelos a serem estudados (GORDON, SULAIMAN e BOYD, 2003; NAVARRO et al., 2007; SERGER et al., 2022; IRISARRI, 2023). Já outros fatores podem ser modificáveis, como tornar o microambiente, tão importante para regeneração, mais favorável, seja através de modificações físicas, como, por exemplo, o uso de enxertos tubulares (GOULART et al., 2016; MARTINEZ et al., 2018; DURÇO et al., 2020).

Outra forma de favorecer a regeneração é através do uso de terapias moleculares, como através do uso da inosina (CARDOSO et al., 2019) ou de terapias baseadas no exercício, que além de modular o microambiente são capazes de ativar os motoneurônios promovendo uma neuroplasticidade positiva para a recuperação funcional (GOULART et al., 2014; JAISWAL, et al., 2020).

A recuperação funcional é o objetivo principal após as LNP e normalmente refletem uma regeneração adequada do nervo, sendo que, um dos principais modificadores de desfecho é o tempo de regeneração, fator este inversamente proporcional a uma boa regeneração. Acelerar a regeneração dos axônios é frequentemente considerado um alvo terapêutico chave para melhorar a recuperação funcional (GORDON, 2020). Neste contexto, investigamos os efeitos do exercício em esteira e da terapia molecular com inosina na regeneração e na recuperação da funcionalidade após a lesão e reparo do nervo isquiático de camundongos.

O treinamento em esteira foi escolhido por possuir algumas vantagens em relação a outras modalidades, tais como: (i) o gestual do exercício é consistente com o gestual diário dos camundongos; (ii) os camundongos se exercitam independentemente em seus respectivos corredores, não interferindo uns com os outros e, portanto, tendo menos interações potencialmente confusas entre si; e (iii) comparado com as demais modalidades de treinamento, o movimento da esteira pode ser mais preciso em termos de regulação da carga do exercício, inclinação da superfície e velocidade (SUN et al., 2019).

Para reparo do nervo isquiático, foi utilizado o enxerto tubular de PLA, uma técnica que já possui resultados promissores, demonstrando, em estudos anteriores, um aumento no número de fibras mielínicas e uma melhor recuperação da funcionalidade dos animais submetidos a este procedimento, sendo o enxerto tubular de PLA eficaz para dar suporte ao crescimento axonal tornando-se uma alternativa potencial ao autoenxerto (GOULART et al., 2016; DURÇO et al., 2020). Ainda que tenha bons resultados, o uso isolado desta estratégia não possibilita uma recuperação funcional próxima à apresentada anteriormente à lesão. Dessa forma, o uso de terapias complementares associadas pode ser uma alternativa viável para melhorar a recuperação após o evento lesivo.

De fato, nossos resultados funcionais demonstraram que não somente o exercício em esteira ou a inosina de forma isolada foram capazes de melhorar e antecipar a recuperação funcional dos animais, como seu uso combinado potencializou essa recuperação. Em estudos prévios, as terapias baseadas em exercício foram capazes de gerar uma melhora funcional após a LNP (SERGER et al., 2022), sendo associadas principalmente à capacidade do exercício em regular positivamente fatores tróficos como o BDNF e o NGF (ALVES et al., 2018). Além disso, o exercício exige a ativação do motoneurônio, sendo esta indispensável para uma melhora na recuperação funcional (JAISWAL et al., 2020; MINEGISHI et al., 2022). Da mesma forma, as terapias baseadas no uso de purinas, como a inosina, demonstraram bons resultados em lesões mais brandas, como as lesões compressivas do nervo isquiático (CARDOSO et al., 2019) e em lesões do trato córtico espinal (BENOWITZ et al., 1999; KIM et al., 2013). A inosina, ao ser metabolizada, apresenta propriedades neuroprotetoras e neuromoduladoras (JURKOWITZ et al., 2002; HASKÓ, SITKOVSKY e SZABÓ, 2004). Ademais, por se tratar de um agonista

dos receptores de adenosina, como o A2A e A3, acredita-se que o papel da inosina na recuperação funcional esteja vinculado à regulação positiva de fatores neurotróficos como BDNF e NGF e à neuroproteção (ALMEIDA, CARDOSO e MARTINEZ, 2021).

Através do IFI, notamos que o grupo Inosina + Exercício apresentou um melhor índice em comparação aos grupos Salina e Inosina. Ainda, o grupo Salina + Exercício também mostrou melhor desempenho em relação ao grupo Salina. Esses resultados sugerem que a combinação de Inosina e exercício promoveu uma recuperação mais eficaz da função motora. Quando se trata das funções motoras, muitos animais dependem de informações descendentes do cérebro para iniciar e executar adequadamente tais funções, principalmente quando se trata da locomoção (ROTTERMAN et al., 2019). Os animais que foram submetidos ao exercício em esteira apresentaram melhor desempenho quando comparados aos que não foram expostos ao protocolo de exercício em esteira, demonstrando que o exercício tem papel chave na recuperação da função motora. Terapias dependentes de atividade, como exercícios em esteira, promovem a regeneração axonal e a recuperação da função motora após LNP. A promoção da regeneração axonal facilita a reinervação da junção neuromuscular e, por meio do exercício, há um aprimoramento aferente nos motoneurônios reconectando-os aos aferentes primários e aos motoneurônios que se retraíram. Assim, atenuando as alterações na circuitaria medular e restabelecendo a função sináptica (MINEGISHI et al., 2022).

Ainda sobre a recuperação funcional, nossos resultados evidenciaram que tanto o exercício em esteira quanto a administração de inosina foram eficazes na melhoria da recuperação das funções somatossensoriais. No Teste da Picada do Alfinete, realizado na oitava semana pós-lesão, os grupos tratados com Inosina + Exercício, Salina + Exercício e Inosina apresentaram pontuações superiores em comparação ao grupo tratado apenas com Salina. Além disso, no analgesímetro, observamos que os grupos submetidos ao protocolo de exercício em esteira responderam a menores estímulos pressóricos já a partir da segunda semana, em contraste com os grupos não submetidos ao exercício. Esses resultados indicam uma recuperação mais próxima da normalidade em relação à sensibilidade dolorosa cutânea nos grupos que receberam intervenções. Nossos resultados reforçam o que foi apresentado por CARDOSO e colaboradores (2019) e GOULART e colaboradores

(2014), que também indicaram que tanto a inosina quanto o exercício, respectivamente, foram capazes de melhorar e antecipar a recuperação das funções somatossensoriais. Além disso, mostraram que a combinação das duas intervenções pode ser uma estratégia para uma melhor recuperação funcional tanto motora quanto somatossensorial.

Sabe-se que tanto a regeneração quanto a remielinização do axônio estão subjacentes à recuperação funcional dos nervos periféricos (SERGER et al., 2022). Na clínica, o padrão ouro para avaliar a capacidade do nervo de propagar o potencial de ação é a eletroneuromiografia. A partir da análise do traçado eletromiográfico do PAMC, percebemos que tanto a inosina quanto o exercício possuem uma influência positiva na regeneração axonal. Sabe-se que há uma correlação positiva entre as forças de contração e as amplitudes do PAMC (GORDON, 2020). Vimos que os grupos tratados, seja isoladamente ou com as terapias combinadas, apresentaram valores semelhantes aos animais que não sofreram a lesão. Ainda, os animais que receberam somente o veículo, apresentaram menor amplitude e latência, evidenciando que as terapias aplicadas são importantes aliadas na recuperação dos nervos lesionados.

Morfologicamente é possível perceber que os grupos que receberam alguma intervenção além do veículo, apresentam uma melhor organização do microambiente do nervo regenerado, principalmente no grupo que recebeu o tratamento combinado (inosina + exercício), apresentando maiores áreas de axônios, de mielina e, conseqüentemente, maiores áreas das fibras, quando comparado ao grupo salina. De acordo com CHOMIAK e HU (2019) para que uma fibra nervosa possua maior eficiência na propagação do impulso nervoso, é necessário que ela tenha uma razão G ideal, na faixa de 0,55 a 0,68, o que pode ser observado no grupo inosina e no grupo inosina + exercício. Esses resultados apontam para uma regeneração mais funcional nesses grupos. Tal resultado pode ser explicado pelo papel agonista da inosina em relação aos receptores A2A, que podem regular positivamente a expressão de GAP-43, sendo esta uma proteína fundamental na regeneração axonal (IRWIN et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016). Além disso, o exercício é capaz de reduzir as alterações na densidade do receptor A2A nas vias centrais de maneira a promover uma melhor atividade locomotora (BAUER et al., 2020). Essas influências tanto da

inosina quanto do exercício e seus efeitos combinados apresentam importante papel na organização e na regeneração do nervo.

Estudos em modelos animais e na clínica humana demonstram que a abordagem sistêmica pode ser uma estratégia potencial para prevenir a neurodegeneração, podendo estar associados principalmente à regulação positiva de fatores neurotróficos como o BDNF e NGF (TARI et al., 2019). O efeito sistêmico do exercício em esteira também é capaz de induzir essa neuromodulação (ALVES et al., 2018), assim como a inosina (CARDOSO, MARTINEZ E ALMEIDA, 2021). A neuromodulação pode estar associada à ativação de receptores de adenosina, principalmente os receptores A2A, presentes nas CS.

Ao analisarmos tanto os GRD quanto o corno anterior das medulas espinais dos animais, percebemos um maior número de nucléolos de neurônios sensitivos e motores, respectivamente, indicando um maior número de neurônios presentes nestas regiões, tanto nos grupos que receberam o tratamento com inosina, quanto nos que foram submetidos ao protocolo de exercício em esteira, quando comparados ao grupo salina. Esses resultados sugerem um possível efeito neuroprotetor nos grupos que receberam alguma dessas intervenções.

Além de termos observado um maior número de corpos de neurônios presentes nos GRD e no corno anterior das medulas espinais, as análises por imunohistoquímica para NF200 revelaram que os animais dos grupos que receberam o tratamento com inosina e/ou exercício apresentaram uma melhor organização tecidual e maior área marcada quando comparados ao grupo salina. É sabido que, conforme o axônio amadurece, gradualmente adquire mais neurofilamentos pesados, promovendo a formação de um citoesqueleto axonal altamente estável (PERROT et al., 2008; YUAN et al., 2017). Os neurofilamentos são essenciais para o crescimento radial e estabilidade estrutural das fibras mielínicas (PERROT et al., 2008; YUAN et al., 2017). Este resultado corrobora nossos achados que mostraram maiores áreas de axônio, fibra e mielina nos animais tratados com inosina e exercício, o que pode indicar um processo de regeneração mais avançado.

Além disso, notamos uma maior área relativa imunomarcada para os receptores A2A, indicando uma maior presença de receptores A2A no microambiente

de regeneração do nervo isquiático. Em outros modelos, uma maior quantidade de receptores A2A implicou em uma série de processos favoráveis à regeneração neuronal, incluindo redução da inflamação através da redução significativa da infiltração de macrófagos (AWAD et al., 2006; PEDATA et al., 2014). Dessa forma, a ativação dos receptores A2A pode levar à supressão da resposta inflamatória, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuindo a ativação de células do sistema imune (AWAD et al., 2006; PEDATA et al., 2014), contribuindo para um processo de regeneração bem-sucedido. Dessa forma, a maior presença desses receptores no microambiente dos nervos em regeneração, pode explicar os melhores resultados obtidos tanto nas análises funcionais quanto morfológicas dos nervos dos animais dos grupos inosina, salina + exercício e inosina + exercício quando comparados ao grupo salina.

A denervação do músculo esquelético resulta em uma rápida e programada perda de tamanho e desempenho muscular, denominada atrofia muscular (YANG et al., 2020). Em nosso estudo, observamos que os animais dos grupos submetidos ao protocolo de exercício em esteira apresentaram um maior peso seco dos músculos gastrocnêmios do lado ipsilateral à lesão quando comparados aos animais do grupo salina; ainda, os animais do grupo inosina + exercício, mantiveram a diferença ao normalizarmos os valores em relação ao lado contralateral. Sendo assim, a terapia combinada pode ser uma boa estratégia para evitar a perda ponderal da musculatura, após lesão e reparo do nervo isquiático.

Em nossos resultados, os animais dos grupos que receberam inosina e/ou exercício, apresentaram maiores áreas da fibra muscular quando comparados aos animais do grupo salina. Sabe-se que a inervação desempenha um papel crucial no desenvolvimento, maturação e funcionamento do músculo. O número de fibras musculares inervadas por um motoneurônio, conhecida como razão de inervação, é um dos três determinantes da força contrátil, sendo o tamanho da fibra muscular e a força específica os outros dois fatores (GORDON; DE ZEPETNEK, 2016, MINEGISHI et al., 2022). Ademais, à medida que as relações de tamanho das fibras retornam nos músculos reinervados, as fibras nervosas recuperam seu tamanho normal (GORDON, 2020). Em concomitância, os animais dos grupos submetidos ao protocolo de exercício apresentaram um maior número de fibras musculares quando comparados ao grupo salina. Além disso, os que receberam tratamento com inosina + exercício

apresentaram um maior número de fibras também quando comparados ao grupo inosina. Em geral, a associação do exercício com a inosina apresentou melhores resultados, indicando ser uma alternativa interessante na manutenção da musculatura.

Esses resultados sugerem de forma consistente que a combinação de inosina e exercício promoveu melhorias significativas na recuperação funcional, sensibilidade cutânea, e regeneração axonal em animais com lesão por transecção seguida de reparo com tubulização do nervo isquiático. Esses achados fornecem uma base sólida para a compreensão dos mecanismos envolvidos na recuperação após lesão nervosa e podem ter implicações importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras.

6. CONCLUSÃO

1. Os animais do grupo Inosina + Exercício mantiveram um melhor IFI ao longo do tempo, indicando uma melhor qualidade de marcha em comparação ao grupo Salina. A combinação de inosina com exercício parece ser eficaz na melhoria da recuperação da função motora após lesão do nervo isquiático.
2. Para as análises das funções sensitivas, os resultados sugerem de forma clara uma possível antecipação na regeneração de fibras sensitivas nos grupos submetidos ao protocolo de exercício em esteira em comparação ao grupo Salina.
3. De acordo com a análise da eletrofisiologia, os resultados sugerem que a intervenção com Inosina, especialmente quando combinada com exercício, pode promover a regeneração axonal de forma mais eficaz, aproximando os valores dos grupos tratados aos do grupo controle sem lesão.
4. As análises morfológicas e morfométricas sugerem que as intervenções com Inosina, especialmente quando combinadas com exercício, promovem uma melhor regeneração axonal e funcionalidade do nervo isquiático após lesão, evidenciada pelo aumento no número de fibras mielínicas, maiores áreas de axônio e mielina, e melhores percentuais na Razão G.
5. Os resultados indicam que as intervenções com Inosina e Exercício em Esteira são capazes de promover uma maior sobrevivência de neurônios sensitivos e motoneurônios, 8 semanas após a lesão e reparo do nervo isquiático in vivo.

Estes achados sugerem que tais intervenções possuem uma forte capacidade neuroprotetora, contribuindo para a recuperação funcional após a lesão.

6. Os resultados da imunohistoquímica para NF200 indicam que as intervenções com Inosina, Exercício em Esteira e a combinação de ambos promovem uma maior presença e distribuição de axônios nos nervos isquiáticos, evidenciada pela maior área de marcação para NF200. A terapia combinada (Inosina + Exercício) mostrou-se particularmente eficaz, apresentando a maior porcentagem de área imunomarcada, sugerindo um efeito sinérgico das intervenções na promoção da regeneração axonal.
7. Os resultados da imunohistoquímica para A2Ar indicam que as intervenções com Inosina, Exercício em Esteira e a combinação de ambos promovem uma maior presença e localização dos receptores de adenosina A2A nos nervos isquiáticos, evidenciada pela maior área de marcação para A2Ar. Esses achados sugerem que a Inosina e o Exercício podem estar potencializando a expressão ou a disponibilidade dos receptores de adenosina A2A, o que pode ter relevância na regulação de processos de reparo e regeneração nervosa.
8. Os resultados evidenciam que o protocolo de exercício em esteira motorizada, especialmente quando combinado com Inosina, promove um aumento significativo no volume dos músculos gastrocnêmios, tanto em termos de peso absoluto quanto de área e número de fibras musculares. Esses achados sugerem que a combinação de Inosina e exercício pode ter efeitos positivos na recuperação muscular após lesão nervosa, destacando-se como uma estratégia potencial para promover a reabilitação muscular.

REFERÊNCIAS

- ALLODI, I.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. **Progress in Neurobiology**, v. 98, n. 1, p. 16–37, jul. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.05.005>>
- ALMEIDA, F. M.; CARDOSO, F. S. S.; MARTINEZ, A. M. B. Inosine: a novel treatment for sciatic nerve injury. **Neural Regeneration Research**, v. 16, n. 1, p. 127, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.286969>>
- ALVES, A. et al. Effect of swimming training on nerve morphological recovery after compressive injury. **Neurological research**, v. 40, n. 11, p. 955–962, 9 ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1504180>>
- AWAD, A. S. et al. Adenosine A2A receptor activation attenuates inflammation and injury in diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology-renal Physiology**, v. 290, n. 4, p. F828–F837, 1 abr. 2006. Disponível em <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00310.2005>>
- BAUER, E. E. et al. Exercise-Induced Adaptations to the Mouse Striatal Adenosine System. **Neural Plasticity**, v. 2020, p. 1–11, 28 jan. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2020/5859098>>
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. [s.l.] Artmed Editora, 2017.
- BENOWITZ, L. I. et al. Inosine stimulates extensive axon collateral growth in the rat corticospinal tract after injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13486–13490, 9 nov. 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13486>>
- BILCHAK, J. N.; CARON, G.; CÔTÉ, M.-P. Exercise-Induced Plasticity in Signaling Pathways Involved in Motor Recovery after Spinal Cord Injury. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, 4 maio 2021. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms22094858>>
- BILLET, F. et al. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 1, p. 24, 2019. Disponível em: <<http://10.4103/1673-5374.243699>>
- BURNSTOCK, G.; RALEVIC, V. Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 102–192, 11 dez. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1124/pr.113.008029>>
- CAMPBELL, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clinical Neurophysiology**, v. 119, n. 9, p. 1951–1965, set. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2008.03.018>>
- CARDOSO, F. S. S. et al. Inosine Accelerates the Regeneration and Anticipates the Functional Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury in Mice. **Neuroscience**, v. 423, p. 206–215, dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.09.023>>

CHANG, B. et al. Molecular mechanisms in the initiation phase of Wallerian degeneration. **European Journal of Neuroscience**, v. 44, n. 4, p. 2040–2048, 30 maio 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/ejn.13250>>

CHEN, P.; PIAO, X.; BONALDO, P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. **Acta Neuropathologica**, v. 130, n. 5, p. 605–618, 1 nov. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1482-4>>

CHOI, E. J. et al. Neural Ablation and Regeneration in Pain Practice. **The Korean Journal of Pain**, v. 29, n. 1, p. 3, 2016. Disponível em: <<http://doi.10.3344/kjp.2016.29.1.3>>

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**, v. 4, n. 11, p. e7754, 13 nov. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007754>>

CHIONO, V.; TONDA-TURO, C. Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering. **Progress in Neurobiology**, v. 131, p. 87–104, ago. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.06.001>>

COLEMAN, M. P.; HÖKE, A. Programmed axon degeneration: from mouse to mechanism to medicine. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 183–196, 9 mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41583-020-0269-3>>

CONTA, A. C.; STELZNER, D. J. Immunomodulatory effect of the purine nucleoside inosine following spinal cord contusion injury in rat. **Spinal Cord**, v. 46, n. 1, p. 39–44, 3 abr. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.sc.3102057>>

DAVAA, G. et al. Exercise Ameliorates Spinal Cord Injury by Changing DNA Methylation. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 143, 12 jan. 2021. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3390%2Fcells10010143>>

DE MEDINACELI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, v. 77, n. 3, p. 634–643, set. 1982. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(82\)90234-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(82)90234-5)>

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149–158, ago. 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(00\)00276-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(00)00276-1)>

DURÇO, D. F. P. A. et al. Grafts of human adipose-derived stem cells into a biodegradable poly (acid lactic) conduit enhances sciatic nerve regeneration. **Brain Research**, v. 1747, p. 147026, nov. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147026>>

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 110, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-110>>

GLENN, T. D.; TALBOT, W. S. Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23,

n. 6, p. 1041–1048, dez. 2013. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.06.010>>

GORDON, T. Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8652, 17 nov. 2020. Disponível em: <<http://doi.org/10.3390/ijms21228652>>

GORDON, T.; DE ZEPETNEK, J. E. T. Motor unit and muscle fiber type grouping after peripheral nerve injury in the rat. **Experimental Neurology**, v. 285, p. 24–40, nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.08.019>>

GORDON, T.; ENGLISH, A. W. Strategies to promote peripheral nerve regeneration: electrical stimulation and/or exercise. **European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 3, p. 336–350, 14 ago. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/ejn.13005>>

GORDON, T.; SULAIMAN, O.; BOYD, J. G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 8, n. 4, p. 236–250, dez. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1085-9489.2003.03029.x>>

GOULART, C. O. et al. A Combination of Schwann-Cell Grafts and Aerobic Exercise Enhances Sciatic Nerve Regeneration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110090, 15 out. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110090>>

GOULART, C. O. et al. Evaluation of biodegradable polymer conduits – poly(L-lactic acid) – for guiding sciatic nerve regeneration in mice. **Methods**, v. 99, p. 28–36, 1 abr. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.008>>

HASKÓ, G.; SITKOVSKY, M. V.; SZABÓ, C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. **Trends in pharmacological sciences**, v. 25, n. 3, p. 152–157, 1 mar. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.01.006>>

HOUSHYAR, S.; BHATTACHARYYA, A.; SHANKS, R. Peripheral Nerve Conduit: Materials and Structures. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 8, p. 3349–3365, 19 jun. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00203>>

HUANG, Y. et al. Schwann cell promotes macrophage recruitment through IL-17B/IL-17RB pathway in injured peripheral nerves. **Cell reports**, v. 43, n. 2, p. 113753–113753, 1 fev. 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113753>>

INSERRA, M. M.; BLOCH, D. A.; TERRIS, D. J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery**, v. 18, n. 2, p. 119–124, 1998. Disponível em: <10.1002/(sici)1098-2752(1998)18:2<119::aid-micr10>3.0.co;2-0>

IRISARRI, C. History of peripheral nerve injuries. **Journal of hand surgery. European volume**, 20 set. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/17531934231198455>>

IRWIN, N. et al. Mst3b, a purine-sensitive Ste20-like protein kinase, regulates axon outgrowth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 48, p. 18320–18325, 28 nov. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.0605135103>>

- JAISWAL, P. B. et al. Motoneuron activity is required for enhancements in functional recovery after peripheral nerve injury in exercised female mice. **Journal of neuroscience research**, v. 98, n. 3, p. 448–457, 3 ago. 2020. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1002%2Fjnr.24109>>
- JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 671–682, 1 set. 2005. Disponível em: <<http://doi.10.1038/nrn1746>>
- JESSEN, K. R.; MIRSKY, R.; LLOYD, A. C. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 7, p. a020487, 8 maio 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a020487>>
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. Histologia básica, texto e atlas. 13ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2017.
- JUNQUEIRA, S. C. et al. Inosine, an Endogenous Purine Nucleoside, Suppresses Immune Responses and Protects Mice from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: a Role for A2A Adenosine Receptor. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 3271–3285, 30 abr. 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s12035-016-9893-3>>
- JURKOWITZ, M. S. et al. Adenosine, Inosine, and Guanosine Protect Glial Cells During Glucose Deprivation and Mitochondrial Inhibition: Correlation Between Protection and ATP Preservation. **Journal of Neurochemistry**, v. 71, n. 2, p. 535–548, 13 nov. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71020535.x>>
- KANDEL, E. R. Princípios De Neurociências. 5ª ed., Porto Alegre: McGraw-Hill. 2014.
- KHALED, M. M. et al. Regenerative Strategies in Treatment of Peripheral Nerve Injuries in Different Animal Models. **Jo'jig gonghag gwa jaesaeng uihag/Tissue engineering and regenerative medicine**, v. 20, n. 6, p. 839–877, 12 ago. 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13770-023-00559-4>>
- KIM, D. et al. Inosine Enhances Axon Sprouting and Motor Recovery after Spinal Cord Injury. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81948, 2 dez. 2013. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0081948>>
- KUMAR, S. et al. Swimming Exercise Promotes Post-injury Axon Regeneration and Functional Restoration through AMPK. **ENeuro**, v. 8, n. 3, p. ENEURO.0414-20.2021, 1 maio 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1523/eneuro.0414-20.2021>>
- KURICOVA, M. et al. Oral administration of inosine promotes recovery after experimental spinal cord injury in rat. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 11, p. 1785–1791, 10 jun. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10072-014-1840-3>>
- LAVORATO, A. et al. Traumatic peripheral nerve injuries: a classification proposal. **Journal of Orthopaedics and Traumatology**, v. 24, n. 1, p. 20–20, 10 maio 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s10195-023-00695-6>>

LENT, R. Cem bilhoes de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência, São Paulo (SP): Atheneu, 2010.

LIU F et al. Secondary degeneration reduced by inosine after spinal cord injury in rats. **Spinal Cord**, v. 44, n. 7, p. 421–426, 29 nov. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101878>>

LOPES, B. et al. Peripheral Nerve Injury Treatments and Advances: One Health Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 918, 14 jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms23020918>>

MA, C. H. E. et al. Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 11, p. 4332–4347, 1 nov. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI58675>>

MARTINEZ, A., ALLODI, S., UZIEL, D., JUNIOR, C., ABRAMOV, D. Neuroanatomia essencial. São Paulo: Grupo Gen – LTC, 2014.

MARTINEZ, A. B. et al. Comparison of morphological and functional outcomes of mouse sciatic nerve repair with three biodegradable polymer conduits containing poly(lactic acid). **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 10, p. 1811, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.238712>>

MASSOTO, T. B. et al. Mesenchymal stem cells and treadmill training enhance function and promote tissue preservation after spinal cord injury. **Brain Research**, v. 1726, p. 146494, 1 jan. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146494>>

MINEGISHI, Y. et al. Effects of exercise on muscle reinnervation and plasticity of spinal circuits in rat sciatic nerve crush injury models with different numbers of crushes. **Muscle & nerve**, v. 65, n. 5, p. 612–620, 21 fev. 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/mus.27512>>

MODRAK, M. et al. Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. **Journal of Neuroscience Research**, v. 98, n. 5, p. 780–795, 13 out. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jnr.24538>>

RALPH N.A. MURPHY et al. The incidence and management of peripheral nerve injury in England (2005–2020). **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 80, p. 75–85, 1 fev. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjps.2023.02.017>>

MUTO, J. et al. Oral administration of inosine produces antidepressant-like effects in mice. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, 26 fev. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep04199>>

NADI, M. et al. Testing the effectiveness and the contribution of experimental supercharge (reversed) end-to-side nerve transfer. **Journal of Neurosurgery**, v. 130, n. 3, p. 702–711, 18 maio 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3171/2017.12.jns171570>>

NAVE, K.-A. Myelination and support of axonal integrity by glia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 244–252, nov. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature09614>>

- NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 82, n. 4, p. 163–201, jul. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.06.005>>
- NOCERA, G.; JACOB, C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 20, p. 3977–3989, 10 abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03516-9>>
- OLIVEIRA, J. T. et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for improving nerve regeneration. **International Review of Neurobiology**, v. 108, p. 59–77, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-410499-0.00003-4>>
- OSBORNE, N. R.; ANASTAKIS, D. J.; DAVIS, K. D. Peripheral nerve injuries, pain, and neuroplasticity. **Journal of Hand Therapy**, v. 31, n. 2, p. 184–194, abr. 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.jht.2018.01.011>>
- PEDATA, F. et al. AdenosineA2AReceptors Modulate Acute Injury and Neuroinflammation in Brain Ischemia. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–16, 2014. Disponível em <<http://doi.10.1155/2014/805198>>
- PERROT, R. et al. Review of the Multiple Aspects of Neurofilament Functions, and their Possible Contribution to Neurodegeneration. **Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 27–65, 23 jul. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12035-008-8033-0>>
- PINTO, F. et al. Inosine as a Tool to Understand and Treat Central Nervous System Disorders: A Neglected Actor? **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 24 ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.703783>>
- QUARLES, R. H. Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 11, p. 1851–1871, nov. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/pl00012510>>
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 413–492, 1 set. 1998. PMID: 9755289
- REECE, J. B. et al. **Campbell biology**. 10. ed. Boston: Pearson, 2014.
- RIBEIRO, F. F. et al. Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 226–242, 1 maio 2016. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.006>>
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. (EDS.). **Histology: a text and atlas; with correlated cell and molecular biology**. 7. ed. Philadelphia, Pa.: Wolters Kluwer, 2016.
- ROTTERMAN, T. M. et al. Spinal motor circuit synaptic plasticity after peripheral nerve injury depends on microglia activation and a CCR2 mechanism. **The Journal of Neuroscience**, p. 2945–17, 4 mar. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2945-17.2019>>
- SEDDON, H. J. A Classification of Nerve Injuries. **BMJ**, v. 2, n. 4260, p. 237–239, 29 ago. 1942. Disponível em:<<http://doi.10.1136/bmj.2.4260.237>>

- SERGER, E. et al. The gut metabolite indole-3 propionate promotes nerve regeneration and repair. **Nature**, 22 jun. 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-022-04884-x>>
- SCHÜNKE, M.; SCHULTE, E.; SCHUMACHER, U.; VOLL, M.; WESKER, K. Cabeça, pescoço e neuroanatomia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2019.
- SUN, L. et al. Aerobic exercise repairs neurological function after cerebral ischaemia by regulating the nitric oxide. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190068>>
- SUNDERLAND, S. A CLASSIFICATION OF PERIPHERAL NERVE INJURIES PRODUCING LOSS OF FUNCTION. **Brain**, v. 74, n. 4, p. 491–516, 1951. Disponível em: <<http://doi.10.1093/brain/74.4.491>>
- TARI, A. R. et al. Are the neuroprotective effects of exercise training systemically mediated? **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 62, n. 2, p. 94–101, 1 mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pcad.2019.02.003>>
- TAYLOR, C. A. et al. The Incidence of Peripheral Nerve Injury in Extremity Trauma. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 87, n. 5, p. 381–385, maio 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e31815e6370>>
- TOMIGA, Y. et al. Effects of inosine monophosphate and exercise training on neuronal nitric oxide synthase in the mouse brain. **Neuroscience letters**, v. 734, p. 135083–135083, 1 ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135083>>
- VIJAYAVENKATARAMAN, S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. **Acta Biomaterialia**, v. 106, p. 54–69, abr. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.003>>
- VIRGILIO, F. D.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 191, p. 117–123, 1 set. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.011>>
- WALLER, A. 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**, v. 140, p. 423–429, 1850. Disponível em <<http://www.jstor.org/stable/108444>>
- WANG, M. L. et al. Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. **Connective Tissue Research**, v. 60, n. 1, p. 3–9, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1489381>>
- YANG, X. et al. Denervation drives skeletal muscle atrophy and induces mitochondrial dysfunction, mitophagy and apoptosis via miR-142a-5p/MFN1 axis. **Theranostics**, v. 10, n. 3, p. 1415–1432, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.7150%2Fthno.40857>>
- YUAN, A. et al. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 4, p. a018309, abr. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a018309>>