UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Vânia Tognon Miguel

**Estudo sequencial da expressão de citocinas na
plasticidade de nervo periférico de ratos utilizando a
tubulização látero-terminal**

Ribeirão Preto

2018

Vânia Tognon Miguel

**Estudo sequencial da expressão de citocinas na
plasticidade de nervo periférico de ratos utilizando a
tubulização látero-terminal**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Neurologia

Opção: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Tognon-Miguel, Vânia

Estudo sequencial da expressão de citocinas na plasticidade de nervo periférico de ratos utilizando a tubulização látero-terminal, 2018.

113 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Barreira, Amilton Antunes.

1. Axotomia. 2. Neuroinflamação. 3. Citocinas.
4. Regeneração de nervo. 5. Tubulização látero-terminal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tognon-Miguel, Vânia

Estudo sequencial da expressão de citocinas na plasticidade de nervo periférico de ratos utilizando a tubulização látero-terminal

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em: 19/03/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

Instituição: FMRP - USP

Julgamento: Presidente

Assinatura: _____

Profª. Dra. Maria Celia Jamur

Instituição: FMRP - USP

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

Profª. Dra. Valeria Paula Sassoli Fazan

Instituição: FMRP - USP

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto

Instituição: UNESP - Externo

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

*À minha família tão amada e estimada, e
em especial ao meu esposo, **Vinícius**, a quem
espero poder apoiar e orgulhar todos os dias!*

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente ao meu eterno amigo e companheiro, **Vinicius Meirelles**, por ser minha luz, minha espada, meu espelho e alicerce. Por tornar as barreiras menos árduas e os caminhos mais floridos ao longo de nossa longa jornada, durante todos estes belos anos! Obrigada, principalmente, por escolher crescer e caminhar ao meu lado!*

*Aos meus queridos pais, **Sônia Regina Tognon Miguel e Sérgio Miguel**, ao meu avô **Hélio Tognon** (em memória) e às minhas mães de coração, vó **Dude Tognon** e tia **Neuza Tognon**, por disporem confiança imensurável em minhas escolhas, acreditando, apoiando-me e esforçando-se junto a mim, para que eu suprisse todas elas.*

Ao Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental:

*À **Maria Cristina Lopes Schiavoni, Aracy Silva Dias, Giuliana Teixeira e Silvia Helena Escarso**, agradeço por todo auxílio e aprendizado nas diversas etapas desse trabalho!*

*Ao estimado técnico e amigo **Renato Meirelles**, por todo o tempo, disposição, “brainstorms” e dedicação empenhados ao desenvolvimento e refinamento deste trabalho, para que, apesar dos percalços, ele agregasse peso e significados diversos!*

***Sirlene Chaves, Thaísa Tognati, Sandra Marques, Daiana Souza, Silmara Gouvea, Marco Antônio, Larissa, Vivian, Bianca, Fernanda e Ivan**, obrigada pelo agradável convívio ao longo de todos esses anos!*

*Aos responsáveis pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal (FMRP-USP) pela colaboração de trabalho, em especial à **Marlei Augusto**, pela competência e disposição em participar de partes fundamentais do projeto e das análises essenciais para a realização deste.*

*As queridas professoras **Maria Célia Jamur e Constance Oliver** (BIOCEL – FMRP-USP), pelos ensinamentos, orientações e exemplos valiosos, que iniciaram e orientaram o ingresso em minha carreira docente!*

*Aos colegas da pós-graduação, **Rodrigo Conde, Iara Senem e Bruno Fresnedas**, por todo e qualquer tipo de aprendizado. Em especial para **Tatiana Fusco**, amiga tão querida e parceira de viagem!*

*Não menos importante, um agradecimento especial a todos os **animais** utilizados nesse estudo. Suas vidas, por mais breve que tenham sido, não foram em vão! “A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.” (Charles Darwin).*

*E principalmente ao **Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira**, por todos os ensinamentos e pelas oportunidades oferecidas! Grande parte de quem sou hoje devo a você! Onde quer que esteja, espero que se orgulhe da profissional que ao longo desses anos me tornei e a que ainda virei a ser. Nos revemos em breve! Muito Obrigada Professor! “Revoadas de anjos cantando te acompanhem ao teu repouso!” (Hamlet – William Shakespeare)*

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, Muito obrigada!

“Ninguém ignora tudo.

Ninguém sabe tudo.

Todos nós sabemos alguma coisa.

Todos nós ignoramos alguma coisa.

Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

RESUMO

TOGNON-MIGUEL, V. **Estudo sequencial da expressão de citocinas na plasticidade de nervo periférico de ratos utilizando a tubulização látero-terminal**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A tubulização tem sido considerada uma alternativa eficaz no reparo de lesões de nervos por permitir a aplicação local de fatores neurotróficos e facilitar estudos experimentais. A compreensão do mecanismo de ação no processo regenerativo é intrinsecamente dependente da identificação dos componentes moleculares ao longo dos processos degenerativo e regenerativo. A presente tese visa o estudo sequencial da identificação do perfil molecular da resposta imune no processo de regeneração de nervo entre duas técnicas microcirúrgicas: a tubulização látero-terminal (TLT) e a tubulização término-terminal (TTT). Ratas Wistar adultas foram submetidas à transecção bilateral do nervo fibular comum. Na técnica TLT: o nervo fibular foi seccionado e retirado 5mm de sua extensão, o coto proximal foi suturado na musculatura e um tubo de silicone vazio (6mm) foi interposto entre a lateral do nervo tibial (doador) e o coto distal do fibular. Na técnica TTT: o nervo fibular foi seccionado e retirado 5mm de sua extensão, e ambos os cotos foram suturados às extremidades do tubo de silicone vazio. Foram realizados os grupos experimentais: TLT convencional (TLT padrão), TLT com tubo fechado suturado a porção proximal (TLT F-P), TLT com tubo fechado suturado na porção distal (TLT F-D), TTT convencional (TTT padrão), TTT com tubo fechado suturado ao coto proximal (TTT F-P), TTT com tubo fechado suturado ao coto distal (TTT F-D). O controle normal (grupo GN) foi o segmento de nervo retirado para a interposição do tubo. As análises foram realizadas em três tempos pós-cirurgia: 24 horas, 96 horas e 8 dias. As amostras foram processadas em teste comercial para identificação de anticorpos com intuito de determinar a intensidade de expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento presentes no cone de crescimento dos diferentes grupos. Em 24h a expressão de citocinas foi similar entre os grupos, entretanto, o TLT apresentou maior número de quimiocinas expressas em relação ao TTT. O tempo de 96h foi o período com maior número de elementos que apresentaram aumento da expressão em ambos os grupos TLT e TTT, sendo o grupo TLT a apresentar número maior de quimiocinas e fatores de crescimento expressos. Em 8 dias, houve redução dos níveis de expressão de todos os elementos estudados em ambos os grupos, com exceção do CNTF que apresentou aumento de sua expressão no grupo TTT. Os grupos fechados proximais (TLT F-P e TTT F-P) apresentaram perfis de expressão distintos no tempo de 24h, não houve mudanças dos níveis de expressão de nenhum dos elementos do grupo TLT, sendo que, inversamente, o grupo TTT apresentou aumento da expressão de grande parte das proteínas estudadas. Em ambos os grupos TLT F-P e TTT F-P, os elementos investigados retornaram aos níveis basais de expressão em 96h e 8 dias. Os grupos fechados distais (TLT F-D e TTT F-D) apresentaram expressão mínima ou nenhuma dos elementos estudados. O presente estudo demonstrou que há diferenças quanto ao perfil molecular da resposta imune induzida por lesão de nervo entre as técnicas TLT e TTT.

Palavras-chave: 1. Axotomia. 2. Neuroinflamação. 3. Citocinas. 4. Regeneração de nervo. 5. Tubulização látero-terminal.

ABSTRACT

TOGNON-MIGUEL, V. Cytokines expression sequential study in the peripheral nerve plasticity of rats using the end-to-side tubulization. 2018. Doctoral thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Nerve tubulization has been considered an effective alternative to repair nerve damages due to allow the local application of growth factors and to facilitate experimental studies. The action mechanisms comprehension in nerve regeneration is intrinsically dependent of the molecular components identification over the degenerative and regenerative processes. The aim of this study was the sequential analysis of the molecular identification of the immune response in nerve regeneration process between two microsurgical repair techniques: the end-to-side tubulization (EST) and the end-to-end tubulization (ETE). Bilateral transection of the common fibular nerve was done in adults female Wistar rats. EST model: the fibular nerve was sectioned and 5mm from his extension was removed, the proximal stump was sutured in the musculature and an empty silicone tube (6mm) was interposed between the lateral portion of the intact tibial donor nerve and the fibular nerve distal stump. ETE model: the fibular nerve was sectioned and 5mm from his extension was removed, both stumps were sutured to the silicone tube extremities. The experimental groups done: EST conventional (EST standard), EST with closed tube sutured on the proximal portion (EST C-P), EST with closed tube sutured on the distal portion (EST C-D), ETE conventional (ETE standard), ETE with closed tube sutured on the proximal stump (ETE C-P), ETE with closed tube sutured on the distal stump (ETE C-D). The normal control (NG group) was the nerve extension removed to the tube interposition. The analyzes were performed in three times: 24 hours, 96 hours and 8 days. The samples were precessed on an antibody arrays to determine the expression intensity of cytokines, chemokines and growth factors in the growth cone of the different groups. On 24h the cytokine expression was similar between groups, however, the ETE group presented a higher number of the expressed chemokines than EST. The time 96h was the period with higher number of elements that presented increased expression in both groups EST and ETE, being the group EST to presents higher number of the chemokines and growth factors expressed. In 8 days there was expression levels reduced of the all studied elements in both groups, with the exception of CNTF that presented increased expression on ETE group. The proximal closed groups (EST C-P and ETE C-P) presented different expression profiles on the time of 24h, there were no changes in the expression levels of any of the elements of the EST group, whereas, conversely, the ETE group showed increased expression of a large part of the proteins studied. In both groups EST C-P and ETE C-P, the investigated elements returned to baseline levels of expression at the 96h and 8 days dates. The distal closed groups (EST C-D and ETE C-D) presented minimal expression or no expression of the studied elements. This study demonstrates that there are differences referring to the molecular profile of the immune response induced by nerve damage between the EST and ETE models.

Keywords: 1. Axotomy. 2. Neuroinflammation. 3. Cytokines. 4. Nerve regeneration. 5. End-to-side tubulization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática dos cinco graus de dano nervoso segundo Sunderland, 1951.	19
Figura 2. Representação esquemática das cinco fases do processo regenerativo no interior de um conduto tubular ligando os segmentos proximal (P) e distal (D) de um nervo previamente seccionado.	24
Figura 3. Representação esquemática dos principais eventos degenerativos e regenerativos associados à lesão de nervo periférico	28
Figura 4. Ilustração esquemática dos grupos experimentais realizados no estudo.....	43
Figura 5. Imagens dos grupos experimentais realizados no estudo.	44
Figura 6. Ilustração esquemática dos grupos experimentais realizados no estudo e representações dos tecidos retirados para as análises.....	47
Figura 7. Mapa do teste comercial <i>RayBio® C-Series Rat Cytokine Array C2</i> e classificação das 34 proteínas identificáveis	49
Figura 8. Exemplo de quadros obtidos após revelação das membranas por quimioluminescência.....	52
Figura 9. Ilustração esquemática do processamento das amostras e obtenção do número final de réplicas experimentais (n).....	52
Figura 10. Distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no grupo TLT padrão.	59
Figura 11. Distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nos grupos TTT padrão P e D.	64

Figura 12. Distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nos grupos fechados proximais (TLT F-P e TTT F-P)	69
---	----

Figura 13. Distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nos grupos fechados distais (TLT F-D e TTT F-D).....	70
--	----

Figura 14. Expressão sequencial do conjunto de citocinas entre os grupos GN, TLT padrão, TTT padrão P e TTT padrão D	71
---	----

Figura 15. Expressão sequencial do conjunto de quimiocinas entre os grupos GN, TLT padrão, TTT padrão P e TTT padrão D	72
---	----

Figura 16. Expressão sequencial do conjunto de fatores de crescimento entre os grupos GN, TLT padrão, TTT padrão P e TTT padrão D	73
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CINC	químioatraente de neutrófilos induzido por citocina (<i>cytokine-induced neutrophil chemoattractant</i>)
CNTF	fator neurotrófico ciliar (<i>ciliary neurotrophic factor</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DW	degeneração Walleriana
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GN	grupo normal
IFN-γ	interferon-gamma
IL	interleucina
LIX	quimiocina CXC induzida por lipopolissacarídeo (<i>lipopolysaccharide-induced chemokine</i>)
MCP-1/CCL2	proteína quimiotática de monócitos-1 (<i>monocyte chemotactic protein-1</i>)
MEC	matriz extracelular
MIP-1α/CCL3	proteína inflamatória de macrófagos-1 α (<i>macrophages inflammatory protein-1 alpha</i>)
MMP	metaloproteinase de matriz (<i>matrix metalloproteinase</i>)
NGF	fator de crescimento do nervo (<i>nerve growth factor</i>)
NLT	neurorrafia látero-terminal
NTT	neurorrafia término-terminal
PDGF-AA	fator de crescimento derivado de plaquetas-AA (<i>platelet-derived growth factor-AA</i>)
SNP	sistema nervoso periférico
TGF-β	fator transformador de crescimento- β (<i>transforming growth factor beta</i>)
TIMP	inibidores teciduais de metaloproteinases (<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
TLT	tubulização látero-terminal

TLT F-D	tubulização látero-terminal com tubo fechado na porção distal
TLT F-P	tubulização látero-terminal com tubo fechado na porção proximal
TNF-α	fator de necrose tumoral- α (<i>tumor necrosis fator alpha</i>)
TTT	tubulização término-terminal
TTT F-D	tubulização término-terminal com tubo fechado na porção distal
TTT F-P	tubulização término-terminal com tubo fechado na porção proximal
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth fator</i>)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomeação dos grupos por procedimentos cirúrgicos	40
Tabela 2. Elementos identificáveis no <i>kit Rat Cytokine Array C2</i>	48
Tabela 3. Elementos identificáveis no <i>kit Rat Cytokine Array C2</i> escolhidos para as análises e comparações	53
Tabela 4. Valores numéricos de intensidade de expressão no GN	56
Tabela 5. Valores numéricos de intensidade de expressão no grupo TLT padrão em 24 horas após a cirurgia	56
Tabela 6. Valores numéricos de intensidade de expressão no grupo TLT padrão 96 horas após a cirurgia	57
Tabela 7. Valores numéricos de intensidade de expressão no grupo TLT padrão 8 dias após a cirurgia	58
Tabela 8. Valores numéricos de intensidade de expressão nos grupos TTT padrão P e TTT padrão D em 24 horas após a cirurgia	61
Tabela 9. Valores numéricos de intensidade de expressão nos grupos TTT padrão P e TTT padrão D em 96 horas após a cirurgia	62
Tabela 10. Valores numéricos de intensidade de expressão nos grupos TTT padrão P e TTT padrão D em 8 dias após a cirurgia	63
Tabela 11. Valores numéricos de intensidade de expressão no grupo TLT F-P em 24 horas, 96 horas e 8 dias	66
Tabela 12. Valores numéricos de intensidade de expressão no grupo TTT F-P em 24 horas, 96 horas e 8 dias	67
Tabela 13. Valores numéricos de intensidade de expressão nos grupos com tubo fechado na porção distal, TLT F-D e TTT F-D em 24 horas, 96 horas e 8 dias	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Lesão e reparo de nervos periféricos	18
1.2. Tubulização e regeneração	20
1.3. Mecanismos moleculares na degeneração e regeneração de nervo	25
1.3.1. Degeneração	25
1.3.2. Regeneração.....	28
1.4. Citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos.....	30
1.4.1. Citocinas e regeneração de nervo	34
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Animais.....	40
3.2. Grupos experimentais	40
3.3. Procedimentos cirúrgicos	41
3.4. Procedimentos laboratoriais	46
3.5. Detecção das diferentes estruturas por quimioluminescência	46
3.6. Análise de intensidade de expressão das citocinas	51
3.7. Análise estatística	53
4. RESULTADOS	55
4.1. Análise macroscópica	55
4.2. Análise de citocinas por quimioluminescência	55

4.2.1. Nervo normal.....	55
4.2.2. Tubulização látero-terminal (TLT).....	55
4.2.3 Tubulização término-terminal (TTT)	60
4.2.4. Grupos fechados	65
4.3. Expressão sequencial entre grupos	71
4.3.1. Citocinas	71
4.3.2. Quimiocinas.....	72
4.3.3. Fatores de crescimento	73
5. DISCUSSÃO	75
5.1. Grupos fechados	77
5.2. Citocinas	78
5.3. Quimiocinas.....	80
5.4. Fatores de crescimento	82
5.5. Análise estatística dos conjuntos	85
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS	91
8. ANEXOS	112

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão e reparo de nervos periféricos

Lesões em nervos periféricos frequentemente comprometem a qualidade de vida e atividades diárias dos indivíduos lesionados, além de gerar impactos econômicos significativos. Esses acidentes possuem incidência relevante e melhores tratamentos para lesões de nervos são consideradas metas contínuas (DAHLIN, 2004; ARMADA-DASILVA et al., 2014; JUNG et al., 2014). As lesões dos nervos periféricos podem ser ocasionadas devido a causas térmicas, químicas ou danos resultantes de trauma mecânico ou distúrbios degenerativos (ARSLANTUNALI et al., 2014). Após lesão de nervo, a recuperação funcional dependerá do tipo e severidade da lesão. Neurapraxia e axonotmese – lesões habitualmente seguidas de pressão ou esmagamento – possuem prognósticos favoráveis, por contarem com a preservação da continuidade estrutural nervosa. Na neurapraxia ocorre interrupção da condução nervosa, mas com preservação da continuidade axonal, na qual a recuperação é brevemente completada. Na axonotmese, entretanto, há um dano adicional no qual ocorre uma ruptura da continuidade do axônio, mas sem comprometer estruturas tissulares, como os tubos endoneurais. Já a neurotmese implica em transecção completa do nervo periférico, na qual, se não houver reparo das porções nervosas separadas, ocorrerá bloqueio definitivo de condução (RICCIO, MARCHESINI, PUGLIESE, 2018). A neurotmese pode ser classificada em três níveis de acordo com o envolvimento das estruturas internas do nervo: Grau 1 – transecção da fibra nervosa (axônio e endoneuro), mas com preservação do perineuro e epineuro intactos; Grau 2 – transecção dos funículos, apenas tecido epineural mantém a continuidade do nervo; Grau 3 – transecção completa do nervo com ruptura de todas as suas estruturas (SEDDON, 1943; SUNDERLAND, 1951) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática dos cinco graus de dano nervoso segundo Sunderland, 1951. a: nervo normal com seus principais componentes estruturais, b: bloqueio de condução indicado pela seta vermelha, causado por pressão ou esmagamento (neurapraxia), c: transecção axonal e endoneural com perineuro intacto (axonotmese), d: transecção dos funículos, tecido epineural mantém continuidade do nervo (neurotmeze grau 1), e: transecção completa do tronco nervoso (neurotmeze grau 3). Modificado de SUNDERLAND, 1951.

O sistema nervoso periférico (SNP) responderá a transecção axonal com regeneração ativa e espontânea, resultado da ativação da capacidade de crescimento intrínseca dos neurônios, associada a um ambiente local permissivo (THANOS, OKAJIMA, TERZIS, 1998; CHEN, YU, STRICKLAND, 2007). Contudo, o reparo espontâneo de lesões do nervo periférico com perda total de continuidade pode não ocorrer por diversas razões. Nesses casos, o reparo do nervo pode ser realizado através de técnicas microcirúrgicas específicas. A neurografia término-terminal (NTT) é a técnica mais frequentemente utilizada em considerável número de casos (ROVAK, CEDERNA, KUZON, 2001). Entretanto, a aplicabilidade dessa técnica é limitada pela extensão da perda tissular, pois depende diretamente da aproximação e sutura direta entre os cotos proximal e distal do nervo seccionado (SEDDON et al., 1975). Em lesões com extensa perda tissular, enxerto autólogo é a abordagem cirúrgica inicialmente escolhida. Nela, um nervo doador sadio do próprio indivíduo é sacrificado – usualmente nervos sensitivos, por sua retirada ter menor comprometimento funcional – sendo este interposto na lacuna da lesão (JOHNSON, SOUCACOS, 2008; LIN, MANZANO, GUPTA, 2013).

Entretanto, a técnica apresenta limitações, como a necessidade de submeter o paciente a uma segunda cirurgia para obtenção do nervo doador. Consequentemente, há a debilidade e o comprometimento funcional, por menor que seja, pela retirada desse enxerto. Em longo prazo pode ocorrer na área transplantada a formação de neuromas, além de ser considerado um procedimento de alto custo. Esses pontos trazem a necessidade de novos meios de restaurar nervos lesionados (SIEMIONOW, BRZEZICKI, 2009; LAD et al., 2010; DALAMAGKAS, TSINTOU, SEIFALIAN, 2016). Como alternativa para a substituição do uso de enxertos, a neurorrafia látero-terminal (NLT) pode ser uma alternativa nesta eventualidade. Os primeiros registros de reparo através dessa técnica datam do final do século XIX, em estudos que propuseram o procedimento como alternativa de tratamento para situações de espasmo facial (BALLANCE C, BALLANCE H, STEWART, 1903). Entretanto, a técnica foi descartada por resultar em lesão parcial do nervo doador no local de sutura do receptor (KRIVOLUTSKAIA et al., 1989; VITERBO et al., 2009). Décadas depois, experimentalmente, Viterbo e cols. obtiveram sucesso na NLT, interligando o coto distal do nervo fibular seccionado à porção lateral do nervo tibial, sem a realização de janela perineural ou epineural no nervo doador, mantendo-o íntegro (VITERBO et al., 1992). Ainda assim, a NLT torna-se limitada dependendo da extensão da lacuna se houver perda tissular; nesses casos, a interposição de um segmento de nervo autólogo continua sendo considerada a abordagem clínica preferida (BRUSHART, 2011; FARONI et al., 2015). No aspecto funcional, o sucesso da regeneração depende dos axônios crescerem corretamente em direção aos seus órgãos alvos correspondentes, sendo que esse sucesso depende diretamente de diferentes fatores como tipo de lesão e de reparo efetuado, idade do indivíduo, e a distância do local da lesão entre o corpo celular e o músculo desnervado (IDE, 1996; NAVARRO et al., 2003; HALL, 2005; CHEN, YU, STRICKLAND, 2007; PFISTER et al., 2007). Nesse contexto, a utilização de um conduto tubular pode ser uma alternativa substitutiva para o enxerto de nervo quando há a necessidade de reparo entre lacunas extensas, mas com a vantagem de não haver lesão ou comprometimento de um nervo doador.

1.2. Tubulização e regeneração

A tubulização é uma técnica que emprega um conduto tubular, proveniente de materiais distintos e variados (biológicos ou sintéticos), na qual os cotos distal e proximal

de um nervo seccionado serão introduzidos em suas extremidades e fixados (com pontos cirúrgicos ou fatores adesivos), permitindo a reaproximação mas permanecendo uma lacuna entre os cotos (FIELDS et al., 1989; BATTISTON et al., 2005; PFISTER et al., 2007). Essa técnica tem como intuito orientar o crescimento das fibras nervosas em direção ao coto distal, proteger os brotamentos axonais do tecido cicatricial, evitar a formação de neuromas além de proporcionar um microambiente favorável à regeneração através da possibilidade de inserção de fatores neurotróficos no interior do tubo (WEISS, TAYLOR, 1943; CHEN et al., 2000; BATTISTON et al., 2005; CHEN, YU, STRICKLAND, 2007; PFISTER et al., 2007).

A interposição de um tubo entre o coto distal de um nervo lesionado e a porção lateral de um nervo doador, com ou sem a realização de janela epineural ou perineural, refere-se à técnica denominada tubulização látero-terminal (TLT). Nela, o coto distal do nervo lesionado, denominado “nervo receptor”, é ligado a um conduto tubular que por sua vez é conectado à porção lateral da parede de um nervo não lesionado, denominado “nervo doador”, permitindo o brotamento axonal, a reinervação muscular e ainda preservando a função do nervo doador (NASCIMENTO-ELIAS, 2013). Segundo a literatura, um estudo anterior apresentou metodologia similar, aparentemente visando verificar se a técnica era viável para aplicação no homem (TING et al., 1998). Em outros estudos que utilizaram a técnica látero-terminal, com tubos interpostos não rígidos – segmentos de veias (TOS et al., 2000; ULKUR et al., 2003; TOS et al., 2004; GEUNA et al., 2007; MANASSERI et al., 2007; TOS et al., 2007) ou rígidos – tubos de silicone (AL-QATTAN, AL-THYNAN, 1998; THAM, MORRISON, 1998; MATSUMOTO et al., 1999; YAMAUCHI et al., 2000; YAMAUCHI et al., 2001; GRAVVANIS et al., 2003; HAYASHI et al., 2004; GRAVVANIS et al., 2005; AKEDA et al., 2006; LEE et al., 2012), foram aplicadas no nervo doador janelas epineural ou perineural.

A regeneração de nervo guiada por um conduto é uma estratégia promissora para otimizar a regeneração axonal (SIVOLELLA et al., 2014). A fim de se obter uma regeneração bem-sucedida, uma consideração importante é a escolha do tipo do material na fabricação do conduto (RICCIO, MARCHESINI, PUGLIESE, 2018). Além disso, as propriedades do material, como a fácil manipulação, elasticidade, grau de degradação e afinidade das propriedades mecânicas são de particular importância (DEUMENS et al., 2010; DALAMAGKAS, TSINTOU, SEIFALIAN, 2016). Mais promissores, os condutos biodegradáveis apresentam-se como melhores soluções para reconstrução de lacunas de nervos periféricos em pacientes lesionados (TARAS, NANAVATI, STEELMAN, 2005;

TIAN, PRABHAKARAN, RAMAKRISHNA, 2015). Os materiais naturais, absorvíveis e biodegradáveis, possuem a vantagem de proporcionar locais de ligação celular e moléculas de adesão, sendo adequados para o crescimento tissular além de ser compatíveis com o tecido circundante (SARKAR et al., 2013; AIJIE et al., 2018). Nas últimas décadas, técnicas baseadas em biomoléculas que usam fatores neurotróficos liberados no sítio da lesão foram desenvolvidas com intuito de promover e acelerar o crescimento dos neuritos além de aumentar a sobrevivência neuronal (WHITWORTH et al., 1995; OUDEGA, HAGG, 1996; STERNE et al., 1997; HOUWELLING et al., 1998). Adicionalmente, foram desenvolvidas técnicas baseadas em células que aplicam culturas de células fagocíticas no local da lesão para acelerar a remoção dos detritos, e células gliais para secretar fatores neurotróficos (TENG et al., 2002; SYKOVÁ et al., 2006). Assim, o desenvolvimento de condutos tubulares bio sintéticos constituídos por ou que carregam moléculas e células que expressam fatores de crescimento neurotróficos, é considerado uma alternativa promissora para o reparo de lesões ao SNP (ALOVSKAYA et al., 2007). Entretanto, em modelos experimentais, os tubos não absorvíveis são amplamente utilizados, por permitirem o monitoramento do microambiente regenerativo. Dentre os materiais empregados, o silicone destaca-se por ser um material biocompatível e impermeável, além de apresentar características constantes como parede flexível, fina, translúcida, e superfície interna plana e homogênea (HEATH, RUTKOWSKI, 1998; NAVARRO et al., 2003; PFISTER et al., 2007). Adicionalmente, a aplicabilidade desses materiais biocompatíveis e inertes favorece a formação de uma cápsula compacta, capaz de inibir o desenvolvimento de tecido cicatricial (STENSAAS et al., 1989). Impermeável e contínuo, o espaço no interior do tubo de silicone permite avaliar os eventos celulares e moleculares que ocorrem espontaneamente na regeneração (LONGO et al., 1983a; DANIELSEN, VARON, 1995).

Para que seja possível utilizar condutos tubulares com intuito de otimizar a regeneração, a compreensão do processo regenerativo natural no interior desses tubos é um pré-requisito básico (DALY et al., 2012). Como descrito inicialmente por Williams e cols (1983), os eventos desse processo regenerativo podem ser classificados em cinco fases principais (Figura 2): 1. Fase de fluido; 2. Fase de matriz; 3. Fase de migração celular; 4. Fase axonal; 5. Fase de mielinização (WILLIAMS et al., 1983; BELKAS, SHOICHET, MIDHA, 2004; DALY et al., 2012). Sendo assim, após a implantação dos cotos proximal e distal nas extremidades de um tubo de silicone, em seu interior, ocorrem eventos moleculares, celulares e estruturais (DAHLIN, LUNDBORG, 2001). Na

chamada fase de fluido ocorre um acúmulo de fluído corpóreo nas horas iniciais contendo fatores neurotróficos e células inflamatórias (LUNDBORG, LONGO, VARON, 1982; LONGO et al., 1983). Na fase de matriz, durante os primeiros dias, uma matriz que consiste principalmente de fibrina é formada entre as terminações do nervo ligando as duas extremidades. Apresenta formato cônico que se afunila próximo à região distal do tubo. Durante e após a primeira semana ocorre condensação dessa matriz aumentando seu diâmetro. Na fase de migração celular, a matriz fornece suporte para a migração de células entre os dois cotos do nervo (WEISS, TAYLOR, 1944). Na fase axonal, dentro da segunda semana pós-seção, os axônios apresentam-se dentro do conduto, atrás de células de Schwann e fibroblastos. Observações da associação entre os cones de crescimento e células de Schwann sugerem que a matriz basicamente acelular formada inicialmente não é o substrato ideal para o crescimento axonal e que esse crescimento é dependente do suporte celular. Os brotamentos axonais crescem então do segmento proximal do nervo em direção ao distal, atingindo o mesmo dentro da terceira semana. Conforme as fibras nervosas alcançam o segmento distal há uma maior organização da matriz, que cada vez mais se assemelha a uma estrutura nervosa normal e bem vascularizada, evento que se segue pela fase de mielinização (WILLIAMS et al., 1983).

A tubulização, em nível experimental, também permite a manipulação – para melhor ou pior – do microambiente regenerativo (DALY et al., 2012). Além de auxiliar na regeneração de lacunas mais extensas por si só, a intensificação da regeneração pode também ser obtida quando se introduz elementos indutores de regeneração no interior do tubo, como constituintes da matriz extracelular (MEC) (MADISON et al., 1985; SATOU et al., 1986; WOOLLEY, HOLLOWELL, RICH, 1990; BAILEY et al., 1993; LABRADOR, BUTÍ, NAVARRO, 1998; CHEN et al., 2000), fatores de crescimento (HOLLOWELL, VILLADIEGO, RICH, 1990; HOBSON, 2002; DODLA, BELLAMKONDA, 2008) e tipos celulares (ANSSELIN, FINK, DAVEY, 1997; MURAKAMI et al., 2003; MIMURA et al., 2004; PEREIRA-LOPES et al., 2006; CHEN et al., 2007; PEREIRA-LOPES et al., 2010).

Figura 2. Representação esquemática das cinco fases do processo regenerativo no interior de um conduto tubular ligando os segmentos proximal (P) e distal (D) de um nervo previamente seccionado e os componentes principais participantes de cada fase (à direita), segundo Williams e cols, 1983. Modificado de SECKEL, 1990.

Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, utilizou-se a TLT entre o nervo tibial intacto e a porção distal do fibular comum após secção do mesmo. Um tubo de silicone vazio de 6 mm de comprimento foi suturado na lateral do nervo tibial – distalmente à origem do nervo fibular – e ao coto distal do nervo fibular previamente seccionado. O epineuro do nervo tibial ficou intacto (não se fez janela epineural), garantindo assim a integridade do nervo doador. Os animais foram observados em dias e semanas sucessivas sendo observado um cone de crescimento proveniente da lateral do nervo tibial (doador) que se conectou com o coto distal nervo fibular (receptor), tendo havido reinervação do músculo tibial cranial (inervado pelo fibular no rato) comprovada por testes funcionais da marcha, eletroneuromiografia e avaliação histoenzimológica quando avaliaram os animais 70 dias após a TLT. Além disso, observou-se ao adicionar *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) – um indutor do crescimento de fibras nervosas – no interior do tubo, utilizando-se experimento semelhante ao descrito anteriormente, que houve um aumento estatisticamente significativo do número de fibras que atingiram o coto distal em comparação com a TLT com tubo vazio (NASCIMENTO-ELIAS, 2013). A partir desses resultados, obteve-se um modelo para estudo da

plasticidade nervosa com consequente repovoamento das fibras de um nervo seccionado além da reinervação do músculo previamente desnervado com recuperação funcional, e ainda que parcial, um modelo experimental para estudo subsequente e comparativo dos eventos moleculares que ocorrem durante o processo de crescimento do cabo de regeneração na TLT em comparação aos eventos que ocorrem na TTT.

1.3. Mecanismos moleculares na degeneração e regeneração de nervo

1.3.1. Degeneração

Inversamente ao que ocorre no sistema nervoso central (SNC), as fibras nervosas constituintes do SNP possuem a capacidade de regenerar-se espontaneamente após lesão, contudo, regeneração essa frequentemente pobre e incompleta, principalmente em lesões extensas (CHEN, YU, STRICKLAND, 2007; GEUNA et al., 2010; BENOWITZ, POPOVICH, 2011). Reação inflamatória após lesão, como visto em diversos tecidos, é um processo dinâmico dirigido por uma gama de mediadores moleculares e células inflamatórias que participam ativamente do processo de regeneração. O conhecimento detalhado desses mecanismos é importante para aprimorar e facilitar a recuperação funcional após reconstrução de nervo através de engenhieramento de tecidos (CÁMARA-LEMARROY, GUZMÁN-DE LA GARZA, FERNÁNDEZ-GARZA, 2010; DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013; JANJIC, GORANTLA, 2017). Ambos os eventos, celulares e moleculares, criam condições para induzir o crescimento axonal a partir do coto proximal (FU, GORDON, 1997; WEBBER, ZOCHODNE, 2010). Os eventos celulares incluem a degeneração da porção distal dos axônios lesionados, ativação e recrutamento de células fagocíticas (células de Schwann e macrófagos endoneurais residentes e hematógenos) e outros tipos celulares que produzem moléculas sinalizadoras (MUELLER et al., 2003; COLEMAN, 2005; ROTSHENKER, 2011; DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013). Os eventos moleculares compreendem principalmente o processo inflamatório que inclui a modulação da MEC por metaloproteínases de matriz (MMPs) (GANTUS et al., 2006) e aumento da síntese de moléculas sinalizadoras (FU, GORDON, 1997; CÁMARA-LEMARROY, GUZMÁN-DE LA GARZA, FERNÁNDEZ-GARZA, 2010). Essa resposta inflamatória iniciada pela desintegração axonal compreende fatores humorais (ativação do sistema complemento, ciclogeneses e

lipogenases, citocinas e quimiocinas) e componentes celulares (permeabilização da barreira hematoneural e ativação das células fagocíticas) (DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013).

Após secção de nervo, no coto distal da porção proximal, devido ao transporte anterógrado de moléculas sinápticas e estruturais do citoesqueleto, ocorre um acúmulo de material axoplasmático podendo espalhar-se devido ao rompimento da membrana celular dos axônios lesionados (STOLL, JANDER, MYERS, 2002). O corpo celular do neurônio entra em cromatólise, havendo a dissolução dos corpúsculos de Nissl conjuntamente ao deslocamento do núcleo para a periferia e consequente aumento de volume (TERENGHI, 1999; ZOCHODNE, 2000). Iniciada pela ruptura da integridade da membrana axonal juntamente com a entrada de íons extracelulares, a degeneração axonal é rápida e resulta na despolarização dos axônios seccionados, na ativação de proteases sensíveis ao cálcio, assim como no remodelamento do citoesqueleto no local da lesão e também na porção distal do nervo lesionado (XIE, BARRET, 1991; COLEMAN, 2005, TOUMA et al., 2007; WANG, MEDRESS, BARRES, 2012). Ocorre então uma desintegração granular intrínseca do citoesqueleto e fragmentação axonal, que implicam diretamente na ativação celular, na degradação da mielina por fagocitose, e na formação de um ambiente permissivo para a reconstrução tecidual (STOLL et al. 1989; STOLL, HARTUNG, 1992; SHAMASH et al. 2002; GRIFFIN, THOMPSON, 2008). A lesão dá início então a uma gama de processos moleculares sequenciais que ocorrem com o intuito de remover o tecido lesionado e promover a regeneração do nervo (LUNDBORG, 2000). A chamada degeneração Walleriana (DW) é o processo de degeneração progressiva que ocorre na porção distal de nervos periféricos lesionados, sendo um evento sequencial de degradação mielínica e axonal mediado por mudanças celulares e moleculares (WALLER, 1850; STOLL, MÜLLER, 1999; KOEPPEN, 2004; GAUDET, POPOVICH, RAMER, 2011). O dano físico axonal do SNP é acompanhado por um complexo de respostas envolvendo diversos componentes, sendo a DW acompanhada pelos eventos de desdiferenciação das células de Schwann e consequente ativação da resposta imune (BURNETT MG, ZAGER, 2004; GEUNA et al., 2010; DeFRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015). Nos processos de degeneração e regeneração, tipos celulares variados do sistema imune inato e adaptativo (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B) também são recrutados ao local de lesão (RICHARDSON, LU, 1994; BENOWITZ, POPOVICH, 2011). Nas primeiras horas após a lesão, células fagocíticas são recrutadas para degradar a proteína básica da mielina, sendo os neutrófilos os primeiros fagócitos a apresentarem-se no sítio

de lesão, seguidos por macrófagos e células de Schwann desdiferenciadas que auxiliam na limpeza local e dão início à desmielinização (AUSTIN, MOALEM-TAYLOR, 2010; CÁMARA-LEMARROY, GUZMÁN-DE LA GARZA, FERNÁNDEZ-GARZA, 2010). Na porção distal do nervo, como consequência da separação do centro trófico, a perda da continuidade axonal causa o distanciamento, desdiferenciação e ativação das células de Schwann para um fenótipo fagocítico (FROSTICK, YIN, KEMP, 1998; MUELLER et al., 2003; JESSEN, MIRSKY, 2008). Essa mudança fenotípica, pelo menos em parte, ocorre intracelularmente (GUERTIN et al. 2005; LEE et al. 2009; SAITOH, ARAKI, 2010). Recentemente foi visto que nas células de Schwann localizadas na porção distal à lesão, ocorrem mudanças em sua expressão gênica que permitem uma alteração celular de um caráter estático e adesivo para um fenótipo migratório e mesenquimal, no qual essas células passam a compartilhar características fundamentais de células-tronco embrionárias (JOHNSTON et al., 2016; CLEMENTS et al., 2017). Essas células de Schwann, agora ativadas e/ou desdiferenciadas, regulam uma cascata de moléculas sinalizadoras (citocinas e quimiocinas) que estimulam o recrutamento dos macrófagos e outras células do sistema imune (JESSEN, MIRSKY, 2016; HYUNG et al., 2018). A remoção dos detritos de mielina é essencial para o processo de regeneração, pois moléculas como a glicoproteína associada à mielina, constituinte da bainha de mielina do nervo, tem ação inibitória ao crescimento axonal (BARRETTE et al., 2010; DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013).

Dentro das primeiras 24 horas após secção de nervo, grande parte dos axônios distais tornam-se detritos dentre um período inicial pós-lesão compreendido entre 48 e 96 horas (VERDÚ et al., 2000). Nessa primeira fase da DW (Figura 3) ocorre então a degradação de componentes axonais como axoplasma, axolema e mitocôndrias presentes distalmente ao sítio da lesão. Como eventos correspondentes, na degradação proteolítica dos elementos do citoesqueleto axonal estão o influxo de cálcio, a ativação de calpaínas e a fragmentação axonal (SAXENA, CARONI, 2007; DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013). Simultaneamente com a degeneração ocorre a desorganização dos neurotúbulos, neurofilamentos e a fragmentação da bainha de mielina pela ação de macrófagos hematógenos e células de Schwann (IDE, 1996; DAHLIN, 2004; GOMEZ-SANCHEZ et al., 2015). Após a remoção e limpeza dos detritos de mielina, as células de Schwann sintetizam uma membrana basal contendo várias proteínas da MEC e rearranjam-se em colunas formando as bandas de Büngner (FAWCETT, KEYNES, 1990; SCHEIB, HÖKE, 2013; FARONI et al., 2015). Presentes na porção distal do nervo seccionado, essas células

de Schwann alinhadas em bandas são a principal fonte de moléculas sinalizadoras que estimulam e guiam o processo de regeneração axonal, como citocinas, fatores neurotróficos e moléculas de adesão celular (DUBOVY et al., 2011; DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013).

Figura 3. Representação esquemática dos principais eventos degenerativos e regenerativos associados à lesão de nervo periférico. A: Durante a fase inicial (primeiros dias) após lesão axonal, eventos locais degenerativos são acompanhados por degeneração retrógrada e anterógrada do axônio e mielina. B: Durante a fase intermediária (alguns dias a semanas), o padrão anterógrado da degeneração Walleriana prossegue com a infiltração de macrófagos contribuindo para a remoção de detritos de tecido, e células de Schwann (CS) submetidas à mitose. O corpo celular neuronal axotomizado sofre alterações cromatolíticas e a extremidade proximal cortada do axônio desenvolve brotamentos axonais regenerativos. C: Dos numerosos brotos axonais que atravessam com sucesso o local da lesão (durante as primeiras semanas a meses), alguns adentram os tubos endoneurais apropriados e continuam estendendo-se através do coto distal do nervo, tendo suporte das CS nas bandas de Büngner. O órgão / tecido alvo (neste caso, o músculo esquelético) sofre atrofia muscular. D: A regeneração bem-sucedida do axônio através das bandas de Büngner e o restabelecimento da neurotransmissão na junção neuromuscular resultam na retração ou morte dos brotos axonais malsucedidos, na reversão da atrofia das fibras musculares, da cromatólise do corpo celular neuronal e do estabelecimento da maturação da relação axônio-CS (reduzindo o espaçamento internodal). Adaptado de DEUMENS et al., 2010.

1.3.2. Regeneração

Durante a fase de regeneração, no segmento proximal de nervos seccionados, ocorrem alterações na organização celular. No corpo celular ocorre aumento no metabolismo celular e na síntese protéica, principalmente de tubulina e actina (DAHLIN, 2004). Na extremidade distal do coto proximal à lesão, surgem brotamentos axonais que atravessam

o local da lesão dando continuidade a seu crescimento dentre as bandas de Büngner (FAWCETT, KEYNES, 1990; LUNDBORG, 2000). Há também a formação de um cone de crescimento (blastema) formado a partir de um tecido epitelial especializado em expansão, cuja função é explorar o microambiente através de movimentos constantes, a fim de direcionar a regeneração axonal para os órgãos alvo (DENT, GUPTON, GERTLER, 2011; JOHNSTON et al., 2016; PIROTTE et al., 2016, TANAKA, 2016).

Dentro das primeiras 24 horas após lesão, inicialmente à regeneração axonal, um filamento constituído de fibrina, células não neurais, vasos sanguíneos e componentes da MEC se forma conectando os cotos (LUNDBORG, HANSSON, 1979, 1980; LUNDBORG et al., 1982a/b; NASCIMENTO-ELIAS, 2013). O alongamento dos brotamentos axonais, provenientes do coto proximal, é guiado através das bandas de Büngner pela interação com componentes da lâmina basal das células de Schwann, sendo atraídos distalmente por fatores de crescimento diversos (MARTINI, 1994). Sintetizadas pelas próprias células, a lâmina basal das células de Schwann possui moléculas componentes da MEC (CHERNOUSOV, CAREY, 2000), como laminina (LABRADOR, BUTI, NAVARRO, 1998), fibronectina (VOGELEZANG, SCHERER, FAWCETT, 1999) e colágeno tipo IV (TONGE et al., 1997), componentes conhecidos por auxiliar o crescimento axonal no desenvolvimento normal ou regenerativo. A MEC é uma estrutura em constante síntese e degradação (GANTUS et al., 2006; LU et al., 2011) e após secção de nervo, a reorganização da MEC é de extrema importância para o sucesso da regeneração (TONA et al. 1993; GANTUS et al. 2006; BOSSE, 2012). As enzimas que atuam mais significativamente no remodelamento da MEC são as metaloproteinases (CAWSTON, YOUNG, 2010). As metaloproteinases de matriz (*matrix metalloproteinases* – MMPs) são enzimas especializadas em degradar os componentes da MEC (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; MCCAWLEY, MATRISIAN, 2001; DALEY, PETERS, LARSEN, 2008). As MMPs têm alta afinidade com os inibidores teciduais de metaloproteinases (*tissue inhibitors of metalloproteinases* – TIMP). Os TIMPs são proteínas sintetizadas por diversas células e secretadas na MEC, sendo responsáveis pela regulação, controle e inativação das MMPs. Ao se ligarem às MMPs em uma proporção de 1:1, essa ligação bloqueia a atividade das MMPs (BODE et al., 1999; WERLE, 2008). Os TIMPs, assim como as MMPs, atuam regulando vários processos durante o desenvolvimento normal ou em lesões (BREW, DEENDAYAL, NAGASE, 2000).

Após lesão de nervo, durante a fase inicial da DW, algumas MMPs têm sua expressão modificada com intuito de promover equilíbrio entre os componentes desestabilizados da MEC (HUGHES et al., 2002). A remoção dos fragmentos e eliminação de detritos pelas células fagocíticas é um fenômeno crucial para que haja o remodelamento do tecido e sucesso na regeneração do nervo. Ao longo das fases da DW, a gama de moléculas liberadas (citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos) interferem diretamente no sucesso ou insucesso da regeneração axonal (ECHEVERRY et al., 2011). Adiante à regeneração, o processo de remielinização pelas células de Schwann também é regulado por vários moduladores endógenos, incluindo as proteínas da MEC, fatores neurotróficos e citocinas (BOYD, GORDON, 2003; CHEN, YU, STRICKLAND, 2007).

1.4. Citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos

Citocinas são moléculas mediadoras, polipeptídicas solúveis, envolvidas na sinalização celular. São pequenas proteínas ou glicoproteínas, de baixo peso molecular, produzidas e liberadas por uma gama variada de células, mas em maior parte por monócitos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, linfócitos B e T, queratinócitos, células endoteliais, células musculares lisas, células do parênquima gastrointestinal, células do estroma endometrial e células neoplásicas (JANEWAY et al., 2005; ROITT, BROSTOFF, MALE, 2013). No SNP são sintetizadas principalmente por neurônios, células da glia (células de Schwann e células satélite) e células residentes e recrutadas do sistema imune (DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013). As citocinas atuam principalmente como mediadores químicos, que participam ativamente na regulação de diversas respostas biológicas, tais como crescimento e morfogênese, hematopoese, angiogênese, neurogênese, na ativação celular de respostas imunes, contra infecções, respostas imunes inflamatórias ou no reparo após lesão ou trauma (DINARELLO, 2000; OPAL, DE PALO, 2000; QUATTRINI et al., 2003). Dentre as principais funções das citocinas destacam-se: quimiotaxia, linfoproliferação, atividade pró e anti-inflamatória e efeitos imunomodulatórios variados (ELENKOV et al., 2005). No sistema nervoso, as citocinas juntamente com as quimiocinas atuam na manutenção das condições fisiológicas normais, tendo sua expressão aumentada rapidamente após diversos tipos de estresse, com intuito de retomar a homeostase do tecido nervoso (FREGNAN et al., 2012).

A síntese de citocinas é diretamente induzida pela presença de estímulos variados, que podem ser a presença de produtos bacterianos, especialmente lipopolissacarídeos, o contato com corpos estranhos ou mutações celulares. Sob condições normais, são detectadas no sangue e nos fluidos biológicos em pequenas quantidades, podendo atingir níveis muito elevados em condições específicas, como em inflamações (JANEWAY et al., 2005). As citocinas atuam especialmente por mecanismos parácrinos (em células vizinhas) e autócrinos (nas próprias células produtoras), tendo sua produção de acordo com a necessidade imediata, não sendo armazenadas como moléculas pré-formadas (LIN, CALVANO, LOWRY, 2000). São divididas em diferentes grupos, usualmente classificadas por sua função e não pela estrutura (CURFS, MEIS, HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; SOMMER, WHITE, 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Elas compreendem dois grupos principais: citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, cada qual tendo suas funções específicas, atuando em sinergismo ou antagonismo (QUATTRINI et al., 2003; FREGNAN et al., 2012; DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013). As citocinas possuem a capacidade de atuar não somente em células do sistema imune, mas também em diversas outras células do organismo, podendo agir tanto próximo quanto distante dos locais onde foram sintetizadas (KRAYCHETE, CALASANS, VALENTE, 2006).

Citocinas que possuem propriedades quimiotáticas são denominadas quimiocinas. Essas por sua vez são capazes de atuar em células distantes do local no qual foram produzidas ou encontram-se presentes. Elas induzem a migração de várias populações celulares e, em particular, dos leucócitos (GUERREIRO, SANTOS-COSTA, AZEVEDO-PEREIRA, 2011). Sua ação, primariamente, induz a migração de leucócitos para o local da lesão ou infecção, participando também na transmissão sináptica (OLIVEIRA et al., 2011). As quimiocinas são classificadas de acordo com a presença e posição dos resíduos de cisteína N-terminais, sendo separadas em quatro grupos: quimiocinas CC, que apresentam duas cisteínas adjacentes; quimiocinas CXC, que apresentam um aminoácido entre dois resíduos de cisteína; quimiocinas C, constituída por uma única cisteína e quimiocinas CX3C, constituída por três aminoácidos entre duas cisteínas (CURFS, MEIS, HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; ROLLINS, 1997; ZHANG, AN, 2007; ABBADIE et al., 2009). De acordo com a expressão diferenciada de seus receptores, as quimiocinas recrutam à distância populações distintas de células inflamatórias para atuarem nos sítios de inflamação. Essas moléculas quimioatraentes são secretadas nos sítios de infecção e inflamação por leucócitos recrutados, células

endoteliais e componentes do parênquima, sendo localmente retidas por componentes da MEC e proteoglicanos de superfície celular. Essa ação resulta tanto no aumento de sua meia vida quanto em sua capacidade de induzir estímulo inflamatório (MANTOVANI, 1999; PROUDFOOT et al., 2003).

Citocinas e quimiocinas transduzem sinais do meio externo para o interior das células através de receptores específicos, promovendo a ativação de mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica (CURFS, MEIS, HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997). A combinação de tipos distintos de citocinas e suas concentrações em locais específicos podem diferir e a ação de uma determinada citocina sobre um determinado tecido ou célula pode ser afetada pelo microambiente da célula alvo (ISHIHARA, HIRANO, 2002). Algumas citocinas, além de sua ação direta sobre a resposta celular, podem induzir outras células a liberar e expressar outras citocinas, formando uma cascata e amplificando essa resposta, podendo também apresentar interações sinérgicas ou antagônicas com outras citocinas (ZHANG, AN, 2007; FREGNAN et al., 2012; DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013). Uma única citocina pode exercer pleiotropia funcional (atuar sobre vários tipos celulares diferentes), sendo também redundantes (várias citocinas podem efetuar as mesmas ações), alterando a especificidade celular a partir de sua ação. A redundância é devida à natureza dos receptores de citocinas, sendo eles heterodímeros e/ou heterotrímeros, sendo geralmente agrupados por famílias nas quais uma subunidade seja comum a todos os membros. A ação das citocinas pode ser regulada tanto no interior quanto fora das células alvo. Fora das células, os efeitos das citocinas são regulados pela quantidade de citocinas produzidas e pela duração da disponibilidade de citocinas no microambiente. A duração da ação das citocinas depende diretamente de sua meia-vida e a presença ou ausência de uma matriz que as capture ou concentre sua produção no microambiente. Apenas células que expressem receptores específicos para as citocinas presentes no microambiente responderão aos sinais e efetivarão a resposta. A distância e a força da interação célula-célula, entre as células produtoras e responsivas, também influenciam diretamente na duração e na intensidade dos efeitos das citocinas (HIRANO, 1999; OLIVEIRA et al., 2011; MAYER, 2017). Não apenas as citocinas, mas a ação das diversas categorias de moléculas liberadas no sítio da lesão (citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos) apresenta papel fundamental no sucesso ou insucesso do processo regenerativo (ECHEVERRY et al., 2011).

Os fatores neurotróficos, também chamados de fatores de crescimento, são peptídeos integrantes da família das neurotrofinas relacionados ao sistema nervoso (central e

periférico) com a capacidade de interferir diretamente na sobrevivência e diferenciação de populações neuronais diversas (BOYD, GORDON, 2003; BOSSE, 2012). Esses fatores e seus receptores têm sido extensivamente estudados com base em seus efeitos sobre o crescimento axonal e a sobrevivência neuronal, além de exibir ação relevante no processo de desdiferenciação das células de Schwann e remielinização axonal após lesão (CHAN et al., 2001; BOSSE, 2012).

No processo de regeneração de nervo, a complexa interação entre células, moléculas de adesão, MEC, fatores neurotróficos e citocinas, possui extrema importância, visto que esses fatores controlam a sobrevivência, migração, proliferação e diferenciação de vários tipos celulares envolvidos neste processo (DAHLIN, 2004; AHMED et al., 2005; PFISTER et al., 2007). Estudos *in vivo* têm demonstrado o envolvimento de fatores neurotróficos no sistema nervoso durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal, na idade adulta, e posterior a uma lesão (BOYD, GORDON, 2003). Em um nervo lesionado, os principais fatores neurotróficos presentes são o fator de crescimento do nervo (*nerve growth factor* – NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* – BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (*glial cell-derived neurotrophic factor* – GDNF), fator neurotrófico ciliar (*ciliary neurotrophic factor* – CNTF) e as neurotrofinas 3 e 4 (NT3, NT4), sendo que, após secção de nervo, seus níveis aumentam em conjunto com seus receptores (TANIUCHI et al., 1988; ZOCHODNE, 2000).

Além da ação fagocítica fundamental e limpeza local pelos macrófagos, eles secretam fatores indutores de crescimento que estimulam a proliferação de células de Schwann e fibroblastos, além de promover o aumento de NGF (DANIELSEN, DAHLIN, THOMSEN, 1993; FERNANDEZ-VALLE, BUNGE, BUNGE, 1995; AHMED et al., 2005). Na porção distal à lesão, células de Schwann secretam fatores que auxiliam na sobrevivência neuronal e crescimento axonal, como o NGF, BDNF e a NT-4 (GORDON, 2009). Alguns fatores de crescimento impulsionam o crescimento axonal após lesão do SNP, como o NGF, NT-3 e NT-4 (GOLZ et al., 2006). Estudo *in vivo* demonstrou que a injeção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e INF- γ aumenta a expressão de NGF, NT-3, NT-4 e de seu receptor p75NTR em células dérmicas (BLASING, HENDRIX, PAUS, 2005). Sozinhas ou em ação sinérgica, NGF e NT-3, mostraram promover crescimento axonal após lesão de nervo *in vivo* e *in vitro* (LENTZ et al., 1999; BLOCH et al., 2001).

1.4.1. Citocinas e regeneração de nervo

A inflamação é a principal constituinte da resposta fisiológica de cicatrização e recuperação de lesões mecânicas do SNP (GOLZ et al., 2006). Após lesão de nervo, a elevação nos níveis de citocinas e quimiocinas, provavelmente devido à sua capacidade de regular processos inflamatórios diversos, sugere que essas moléculas possuam papel central tanto na degeneração quanto na regeneração (SHAMASH, REICHERT, ROTSHENKER, 2002; MATSUDA, HUH, JI, 2018). Entretanto, os resultados a respeito da ação das citocinas na regeneração axonal tem sido controversos devido à ação inflamatória das mesmas, e ao grau e tempo das reações inflamatórias nos nervos lesionados. Um efeito benéfico da inflamação local depende diretamente de um controle preciso na produção e liberação das citocinas (JANJIC, GORANTLA, 2017). Sendo assim, os níveis adequados e o mecanismo de equilíbrio dessas citocinas atuantes visando apenas benefícios em nervos lesionados permanecem desconhecidos (AUSTIN, MOALEM-TAYLOR, 2010; DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013).

Durante a primeira fase da DW, a regulação positiva de citocinas e quimiocinas, ativadas principalmente por macrófagos e células de Schwann, está predominantemente associada à destruição de detritos de mielina e recrutamento de macrófagos hematógenos. Seguidamente, ocorre uma fase posterior na qual a expressão das citocinas e quimiocinas está ligada a resposta inflamatória local (TASKINEN et al., 2000; SHAMASH, REICHERT, ROTSHENKER, 2002). Células de Schwann alinhadas nas bandas de Büngner são a principal fonte de citocinas, fatores neurotróficos e moléculas de adesão celular, responsáveis por estimular e guiar os brotamentos axonais aos respectivos órgãos alvos, sendo a interação entre citocinas e neurotrofinas considerada um dos mecanismos pelo qual a ação inflamatória modula o processo de regeneração axonal (GOLZ et al., 2006; DUBOVY et al., 2011; DUBOVY, JANČÁLEK, KUBEK, 2013). Os macrófagos também atuam com papel chave após lesão, tanto no processo neurodegenerativo quanto na regeneração (TASKINEN, ROYTTA, 1997; GAUDET, POPOVICH, RAMER, 2011; YDENS et al., 2012; CHEN, PIAO, BONALDO, 2015). Macrófagos podem alterar seu perfil fagocítico clássico pró-inflamatório (conhecido como M1) para um perfil anti-inflamatório (M2). Macrófagos M1 podem ser ativados através de estímulos, como pela presença de lipopolissacarídeos e interferon- γ (IFN- γ), enquanto a ativação dos macrófagos M2 ocorre tipicamente pela presença das citocinas interleucina (IL) 4 (IL-4), IL-10 e IL-13 (SICA, MANTOVANI, 2012; CHEN, PIAO, BONALDO, 2015). Por sua

vez, os macrófagos M1, de perfil inflamatório, liberam mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo, o fator de necrose tumoral- α (*tumor necrosis factor alpha* – TNF- α), a IL-6 e IL-1 β (MANTOVANI, SICA, LOCATI, 2005; BENOIT, DESNUES, MEGE, 2008). Já os macrófagos M2 produzem mediadores de perfil anti-inflamatório como as citocinas IL-10 e o fator transformador de crescimento- β (*transforming growth factor beta* – TGF- β) (GORDON, 2003; MANTOVANI, SICA, LOCATI, 2005; CHEN, PIAO, BONALDO, 2015).

Além da produção de citocinas por células de Schwann ativadas e macrófagos pró e anti-inflamatórios, tecidos não-neuronais também estão envolvidos na síntese, liberação e regulação de mediadores moleculares, como por exemplo fibroblastos endoneurais que liberam a proteína quimiotática de monócitos-1 (*monocyte chemotactic protein-1* – MCP-1/CCL2), a proteína inflamatória de macrófagos-1 α (*macrophages inflammatory protein-1 alpha* – MIP-1 α /CCL3), o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor* – GM-CSF) e IL-6; células endoteliais secretam MCP-1 e MIP-1 α e macrófagos secretam TNF- α , IL-1 α/β , IL-6 e IL-10, da rede de citocinas funcionais (SHAMASH et al. 2002; CHUI, DOROVINI-ZIS, 2010). Dentre as diversas citocinas consideradas pró-inflamatórias estão principalmente as interleucinas 1, 2, 6, o IFN- γ e o TNF- α , e dentre as anti-inflamatórias estão IL-4, IL-10, IL-13 e o TGF- β (CURFS, MEIS, HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; SOMMER, WHITE, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

Após lesão de nervo periférico, fica claro que tanto a interrupção da morte neuronal quanto os estímulos para a regeneração axonal são pré-requisitos primordiais para que haja um processo regenerativo bem-sucedido atrelado à recuperação funcional. Durante as fases da DW, as alterações moleculares podem constituir respostas tanto positivas como negativas para o desfecho da regeneração, sendo o controle da resposta inflamatória um fator chave para o sucesso. Induzida por moléculas sinalizadoras, essa inflamação pode levar a morte ou proteger os neurônios lesionados (DUBOVY, 2011; DUBOVY et al., 2011). Embora o local da lesão esteja exposto a um ambiente repleto de citocinas liberadas por uma gama de células variadas, pouco se sabe sobre as consequências moleculares e funcionais deste ambiente na regeneração (SIDDIQUI, LIVELY, SCHLICHTER, 2016).

Para tanto, estudos sequenciais do perfil molecular presente no cone de crescimento de nervo em regeneração poderão indicar quais moléculas são expressas e em que momento do crescimento e regeneração há a expressão das referidas proteínas

(citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento), possibilitando futura manipulação e otimização do ambiente regenerativo. O presente estudo visa a identificação do perfil molecular da resposta imune no processo de regeneração de nervo entre duas técnicas microcirúrgicas: a tubulização látero-terminal (TLT) e a tubulização término-terminal (TTT).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

A presente tese de doutorado teve como objetivos:

1. Identificar os mediadores químicos moleculares presentes no cone de regeneração na tubulização látero-terminal (TLT), em diferentes tempos experimentais;
 2. Identificar os mediadores químicos moleculares presentes no cone de regeneração na tubulização término-terminal (TTT), em diferentes tempos experimentais;
 3. Comparar as técnicas microcirúrgicas TLT e TTT quanto ao perfil molecular da resposta imune após lesão de nervo, em tempos sequenciais, mediante das médias de intensidade de expressão dos elementos.
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas ratas *Wistar*, com idade média de oito semanas, pesando entre 300g–320g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, *Campus* de Ribeirão Preto, sendo mantidas até o final dos experimentos no biotério do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental. O trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob protocolo experimental nº 155/2015.

3.2. Grupos experimentais

Os grupos experimentais realizados foram categorizados conforme tabela 1.

Tabela 1. Nomeação dos grupos por procedimentos cirúrgicos

SIGLA DESCRITIVA	MODELO EXPERIMENTAL
GN	Grupo normal
TLT padrão	Tubulização látero-terminal
TLT F-P	Tubulização látero-terminal (tubo fechado-proximal)
TLT F-D	Tubulização látero-terminal (tubo fechado-distal)
TTT padrão P TTT padrão D	Tubulização término-terminal (cotos proximal e distal)
TTT F-P	Tubulização término-terminal (tubo fechado-proximal)
TTT F-D	Tubulização término-terminal (tubo fechado-distal)

Identificação dos diferentes grupos experimentais realizados através de siglas descritivas dos mesmos.

3.3. Procedimentos cirúrgicos

Previamente, os animais foram pesados, anestesiados via intraperitoneal com cloridrato de cetamina (75 mg/kg) + xilazina (15 mg/kg) e posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica. Os olhos dos animais foram protegidos de lesões através da sobreposição de algodão embebido em soro fisiológico. A seguir, foram tricotomizados, sendo realizada antissepsia local com álcool iodado. Após confirmação de completa anestesia foi realizada incisão na região pósterio-lateral da coxa e poplítea, sendo expostos o nervo isquiático e seus ramos, os nervos tibial, fibular comum e sural. O nervo fibular comum foi dissecado sob visão de um microscópio cirúrgico Zeiss®, com ampliação de 16 vezes, utilizando-se técnicas microcirúrgicas.

Em todos os grupos experimentais realizados (Tabela 1, Figuras 4 e 5, Anexo 2), a extensão retirada do nervo fibular foi de 5 mm (lacuna) e os tubos de silicone (Degania Silicone®), interpostos nessa lacuna, medindo 6 mm de comprimento (diâmetro interno de 1,47 mm e diâmetro externo de 1,96 mm).

- **Grupo normal (GN)** – foi realizada secção do nervo fibular comum, 3 mm abaixo da sua origem no nervo isquiático, sendo retirado segmento de 5 mm de sua extensão para análises referenciais como padrão de normalidade.

TUBULIZAÇÃO LÁTERO-TERMINAL (TLT)

- **Grupo TLT padrão** – o nervo fibular comum foi seccionado e foi retirado 5 mm da sua extensão, inicialmente aos 3 mm abaixo da trifurcação do isquiático. O coto proximal do nervo fibular foi suturado sob a pele adjacente com um ponto em U de fio de nylon 10-0 oftalmológico (Bioline®). O coto distal do mesmo nervo foi suturado na extremidade de um tubo de silicone. Na outra extremidade do tubo foi realizada neurorrafia no epineuro do nervo tibial em sua face lateral a uma distância de 3 mm da trifurcação (Figura 4A).

Nos grupos fechados referentes a TLT, o procedimento foi semelhante ao descrito acima (TLT padrão), com a diferença dos tubos de silicone serem selados (fechados) em uma das extremidades com cera ortodôntica rosa.

- **Grupo TLT F-P** – mesmo procedimento cirúrgico do grupo TLT padrão, entretanto, o tubo de silicone teve uma das extremidades suturada na lateral do nervo tibial (análise da porção proximal), e sua outra extremidade selada com cera (Figura 4B).
- **Grupo TLT F-D** – mesmo procedimento cirúrgico do grupo TLT padrão, entretanto, o tubo de silicone teve uma das extremidades suturada ao coto distal do fibular seccionado (análise da porção distal), sendo selada a outra extremidade do tubo (Figura 4C).

TUBULIZAÇÃO TÉRMINO-TERMINAL (TTT)

- **Grupo TTT padrão** – o nervo fibular comum foi seccionado e foi retirado 5 mm da sua extensão, inicialmente aos 3 mm abaixo da trifurcação do isquiático. O coto proximal do nervo fibular foi unido ao coto distal através de um tubo de silicone interposto na lacuna. Nesse grupo padrão, diferentemente do grupo TLT – no qual é investigado apenas o cone de crescimento contido no sítio proximal da tubulização (lateral do nervo tibial) – foram analisados, individualmente, ambos os cotos suturados ao tubo, coto proximal (grupo TTT padrão P) e coto distal (grupo TTT padrão D) (Figura 4D).

Nos grupos fechados referentes a TTT, o procedimento foi semelhante ao descrito acima (TTT padrão), com a diferença dos tubos de silicone serem selados (fechados) em uma das extremidades com cera ortodôntica rosa.

- **Grupo TTT F-P** – o coto proximal do nervo fibular foi suturado à uma das extremidades de um tubo de silicone (análise da porção proximal), sendo sua outra extremidade selada (Figura 4E).
- **Grupo TTT F-D** – o coto distal do nervo fibular foi suturado à uma das extremidades de um tubo de silicone (análise da porção distal), sendo sua outra extremidade selada (Figura 4F).

Os grupos TLT F-P, TLT F-D, TTT F-P e TTT F-D, denominados grupos "fechados", foram realizados para investigação da procedência das moléculas sinalizadoras em cada coto de nervo em regeneração, sem a ação de fatores tróficos, quimiotáticos ou externos.

Figura 4. Ilustração esquemática dos grupos experimentais realizados no estudo. (A, B, C) Grupo tubulização látero-terminal (TLT). (A) TLT padrão, (B) TLT com tubo de silicone fechado na extremidade distal e acoplado à lateral do nervo tibial intacto, (C) TLT com tubo de silicone fechado na extremidade proximal e acoplado ao coto distal do nervo fibular seccionado. (D, E, F) Grupo tubulização término-terminal (TTT). (D) TTT padrão, (E) TTT com tubo de silicone fechado na extremidade distal acoplado ao coto proximal do nervo fibular seccionado, (F) TTT com tubo de silicone fechado na extremidade proximal acoplado ao coto distal do nervo fibular seccionado. – **Figura 4 encontra-se também no Anexo 2** –

Figura 5. Imagens dos grupos experimentais realizados no estudo. (A) Ramos do nervo isquiático esquerdo, (a) nervo fibular comum, (b) nervo tibial, (c) nervo sural. (B) TTT padrão, imediatamente após a cirurgia. Tubo de silicone de 6 mm de comprimento (T). Segmento retirado entre os cotos (lacuna) de 5 mm. (a) segmento proximal do fibular comum, (b) segmento distal do fibular comum, (c) tibial. (C) TLT padrão, imediatamente após a cirurgia. Tubo de silicone de 6 mm de comprimento (T). Segmento retirado entre os cotos (lacuna) de 5 mm. (a) segmento proximal do fibular comum, (b) segmento distal do fibular comum, (c) tibial, (d) sural. (D) Exemplo de grupos com tubo de silicone fechado em uma extremidade com cera ortodôntica rosa: TLT F-P e TLT F-D, imediatamente após a cirurgia. Tubo de silicone de 6 mm de comprimento fechado com cera ortodôntica rosa (TF). (a) segmento proximal do fibular comum, (b) segmento distal do fibular comum, (c) tibial. Barra de escala – 2 mm.

Após os procedimentos cirúrgicos o músculo isquiotibial e a pele dos animais foram suturados utilizando-se fio de algodão 4.0 (Shalon®) e mononylon 4.0 (Shalon®), respectivamente. Para analgesia dos animais durante o pós-operatório, eles receberam água com paracetamol diluído (0,75mg/ml) e dipirona sódica monoidratada em gotas (1 gota via oral/dia). Visando o bem-estar animal, foi realizado enriquecimento ambiental em todas as caixas plásticas nas quais os animais habitaram durante a experimentação através da inserção de caixas de papel (sendo sempre substituídas após abertas ou roídas), promovendo aos animais proteção, conforto, assim como atividades físicas e mentais. Ao longo dos dias até as datas de sacrifício, tiveram livre acesso à ração e água.

Os animais foram sacrificados nos tempos pós-operatórios: 24 horas, 96 horas e 8 dias. Nos grupos TLT, foi retirado o cone de crescimento (blastema) presente na lateral do nervo tibial, e nos grupos TTT o mesmo blastema foi retirado dos cotos de ambos os segmentos seccionados do nervo fibular, coto proximal e distal. Em determinados grupos, quando presente, o cabo de regeneração ligando a porção proximal à distal – presente no interior do tubo – foi coletado e armazenado separadamente para futuras avaliações, assim como o conteúdo líquido.

Após a retirada dos tecidos para análises (imediatamente inseridos em criotubos contendo tampão de lise com inibidor de protease (*Protease Inhibitor Cocktail* P8340, Sigma-Aldrich Inc.), armazenados em freezer -80°C, os animais foram eutanasiados através de dose letal dos mesmos anestésicos usados (três vezes a dose inicialmente administrada para anestesia) por via intraperitoneal, sendo confirmada morte através dos sinais: ausência de sinais cardiorrespiratórios, mucosas pálidas e opacidade córnea. O tampão de lise preparado era composto de agente tamponante HEPES 10mM pH 7.9, cloreto de magnésio ($MgCl^2$) 1,5mM, cloreto de potássio (KCl) 10mM, EDTA 1mM, glicerol 10% e detergente NP40 1%.

Foram utilizados 3 animais por grupo experimental (57 animais no total – excluídos dez animais que não obtiveram resultados regenerativos apropriados), sendo realizados os procedimentos cirúrgicos em ambos os membros posteriores (cirurgia bilateral), somando ao todo 6 amostras de tecidos por grupo que, posteriormente, foram unidas e processadas em conjunto, obtendo assim um “pool” de proteínas com intensidade mínima para serem detectadas nas análises.

3.4. Procedimentos laboratoriais

As avaliações histológicas e de análise de citocinas foram realizadas no cone de crescimento (blastema) e nos 2 primeiros milímetros do cabo de regeneração (quando presente) de ambos os grupos. Quando término-lateral, a partir da sua origem na lateral do nervo tibial, ou quando término-terminal, o cone de crescimento contido nos segmentos proximal e distal (Figura 6).

3.5. Detecção das diferentes estruturas por quimioluminescência

Para identificação inicial das moléculas presentes no nervo regenerado foi utilizado um teste comercial semiquantitativo contendo um conjunto de 34 elementos (*RayBio Rat Cytokine Antibody Array II* – Norgross, GA, USA) – distinguíveis entre citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, proteínas transmembranas, hormônios e enzimas – identificáveis através de quimioluminescência (Tabela 2). Este ensaio permite a identificação simultânea dos níveis de expressão de diferentes elementos moleculares constituintes do rato. A classificação individual dos elementos identificáveis no kit de citocinas está demonstrada na figura 7.

Figura 6. Ilustração esquemática dos grupos experimentais realizados no estudo e representações dos tecidos retirados para as análises. Retângulo em preto representa posição do tubo de silicone. Triângulo laranja representa as porções tissulares retiradas – cone de crescimento ou início do cabo de regeneração (quando presente) – contido no interior do tubo de silicone. (A, B, C) Grupo tubulização látero-terminal (TLT). (A) TLT padrão, (B) TLT com tubo de silicone fechado na extremidade distal e acoplado à lateral do nervo tibial intacto, (C) TLT com tubo de silicone fechado na extremidade proximal e acoplado ao coto distal do nervo fibular seccionado. (D, E, F) Grupo tubulização término-terminal (TTT). (D) TTT padrão, (E) TTT com tubo de silicone fechado na extremidade distal acoplado ao coto proximal do nervo fibular seccionado, (F) TTT com tubo de silicone fechado na extremidade proximal acoplado ao coto distal do nervo fibular seccionado.

Tabela 2. Elementos identificáveis no kit Rat Cytokine Array C2

Activin A	IL-4
Agrin	IL-6
CD86 (B7-2)	IL-10
beta-NGF	IL-13
CINC-1	Leptin
CINC-2alpha	LIX
CINC-3	L-Selectin
CNTF	MCP-1
Fas Ligand	MIP-3alpha
Fractalkine	MMP-8
GM-CSF	PDGF-AA
ICAM-1	Prolactin R
IFN-gamma	RAGE
IL-1alpha	Thymus Chemokine-1
IL-1beta	TIMP-1
IL-1 R6	TNF-alpha
IL-2	VEGF

Atual conjunto de anticorpos comercializados escolhido para estudo da expressão de citocinas e outros elementos (no quadro) em tecidos de ratos (RayBio® C-Series Rat Cytokine Antibody Array C2. RayBiotech, Inc, GA, USA.)

Cada anticorpo é marcado em duplicata verticalmente		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
	1	POS	POS	NEG	NEG	Activin A	Agrin	CD-86 (B7-2)	NGF-betta	CINC-1	CINC-2	CINC-3	CNTF
	2												
	3	Fas Ligand	Fractalkine	GM-CSF	ICAM-1	IFN- gamma	IL-1 alpha	IL-1 betta	IL-1 R6	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10
	4												
	5	IL-13	Leptin	LIX	L-Selectin	MCP-1	MIP-3 alpha	MMP-8	PDGF-AA	Prolactin R	RAGE	Thymus Chemokine-1	TIMP-1
	6												
	7	TNF- alpha	VEGF	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
	8												

POS = Positivo; NEG = Negativo; BLANK = Branco

Citocina	Fator de crescimento	Enzima
Quimiocina	Proteína sinalizadora ou transmembrana	Hormônio

Figura 7. Representação do mapa do teste comercial RayBio® C-Series Rat Cytokine Array C2 e classificação das 34 proteínas identificáveis

Após a coleta do material a ser estudado, as seis amostras de cada grupo foram unidas e maceradas em um homogeneizador de tecidos. Para o preparo das amostras, no dia anterior à leitura das proteínas, em tubos separados (1 por amostra) foi inserido 90µl de NaOH 0,1N e 10µl do homogenado de cada amostra e incubados overnight. No dia seguinte as amostras foram centrifugadas em 14.000 rpm por 10 minutos, sendo retirado 70µl do sobrenadante e inserido em outro tubo contendo 630 µl de NaCl 0,9%. Em outro tubo, foi inserido 100µl do homogenado da amostra e adicionado 1 ml da solução contendo Na₂CO₃ 2%, NaOH 0,1N, CuSO₄ 0,5%, Tartarato Nak 1% e NaOH 0,05N. Após homogeneizar e incubar por 10 minutos foi adicionado em cada tubo uma solução contendo 100 µl do reagente Folin-Ciocalteu fenol. As amostras foram então homogeneizadas, incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos e levadas para leitura. A dosagem de proteínas foi realizada pela técnica Mini Lowry com leitura de absorbância em comprimento de onda 750 nM.

Nas datas a serem realizadas as revelações por quimioluminescência das moléculas presentes nas amostras, primeiramente, foi realizada uma equiparação do volume das amostras em relação à quantidade de proteínas presente por volume, sendo o volume ajustado entre as amostras com tampão fosfato salino (PBS). O kit e seus componentes foram retirados do freezer para equilíbrio da temperatura. As membranas foram posicionadas em placa de acrílico própria do kit, individualmente em poços distintos, com o lado pré-marcado para cima. Pipetou-se 2 ml de tampão de bloqueio em cada poço e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Foi retirado o tampão e pipetado 1 ml da amostra diluída em cada poço e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. Foi retirado o tampão e realizada a 1ª lavagem das membranas com tampões próprios do kit, em ciclos de 6 lavagens por 5 minutos cada. Retirou-se o tampão e foi pipetado 1 ml do preparado com anticorpo biotilado proveniente do kit e incubado por 1,5 horas em temperatura ambiente. A solução com os anticorpos foi então retirada e realizada 2ª lavagem seguindo os mesmos procedimentos das lavagens iniciais. Foi retirado o tampão e inserido 2 ml do concentrado HRP-Streptavidina e incubado em temperatura ambiente por 1,5 horas. Retirou-se o concentrado dos poços e iniciando-se a 3ª lavagem das membranas seguindo os mesmos procedimentos das lavagens anteriores. As membranas foram posicionadas, com o lado marcado para cima, sobre filmes plásticos transparentes próprios do *kit*. Foram pipetados 500 µl do tampão de detecção próprio do kit em cada membrana e incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos. As membranas foram então cobertas por outro filme plástico próprio do *kit* formando uma

espécie de sanduíche, sendo retiradas bolhas de ar presentes. Imediatamente, as membranas foram transferidas para um aparelho ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) com capacidade de captação de sinais quimioluminescentes. As imagens foram obtidas através de um tempo de exposição máximo de 300 segundos e salvas em DVDs para análise posterior.

3.6. Análise de intensidade de expressão das citocinas

Para análise dos resultados foi utilizado o software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc.) para análise de cada elemento identificável no *kit* por densidade óptica dos sinais quimioluminescentes obtidos mediante uma escala de cinza medida em pixels. O resultado de cada elemento foi apresentado em duplicata nas membranas dos diferentes grupos estudados. Foi utilizada a ferramenta *volume tools* para circundar cada sinal (Figura 8). Os resultados numéricos obtidos, referentes à média de intensidade de expressão de cada par de proteína, foram normalizados a partir do controle referencial do próprio teste para possível comparação entre os grupos. Devido a questões financeiras e de tempo hábil, foi executado apenas 1 (um) teste (uma membrana do *kit*) por grupo experimental, sendo o número final de réplicas experimentais (n) igual à 2 dados por grupo (n=2) (Figura 9). As proteínas escolhidas para serem analisadas dentre as disponíveis no teste foram integrantes de 3 categorias: citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Foram analisadas as citocinas: IFN-gamma, IL-1alpha, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e TNF-alpha. Foram analisadas as quimiocinas: CINC-1, CINC-2, LIX, MCP-1 e MIP-3alpha. Foram analisados os fatores de crescimento: Activin A, NGF-beta, CNTF, GM-CSF, fator de crescimento plaquetário (PDGF-AA) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Tabela 3).

Figura 8. Exemplo de quadros obtidos após revelação das membranas por quimioluminescência. (Esquerda) Elementos identificáveis no teste apresentados em duplicata na membrana de um dos grupos estudados. (Direita) Foi utilizada a ferramenta *volume tools* do *software* Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc.) para circundar cada sinal.

Figura 9. Ilustração esquemática do processamento das amostras e obtenção do número final de réplicas experimentais (n). (A) Três ratos são submetidos à cirurgia bilateral dos membros inferiores para obtenção de 6 nervos por grupo experimental. (B) As seis amostras são unidas em tubo único e homogeneizadas, criando assim um “pool” de proteínas com intensidade mínima para serem detectadas nas análises. (C) A amostra homogeneizada do grupo experimental é inserida em membrana constituinte do teste comercial que contém anticorpos para detecção de 34 proteínas de rato. (D) Após revelação por quimioluminescência, a membrana apresenta o valor de intensidade de expressão de cada proteína através de marcações específicas em duplicata (n=2).

Tabela 3. Elementos identificáveis no kit Rat Cytokine Array C2 escolhidos para as análises e comparações.

CITOCINAS	QUIMIOCINAS	FATORES DE CRESCIMENTO
IFN-gamma	CINC-1	
IL-1alpha	CINC-2alpha	Activin A
IL-1beta	LIX	NGF-betta
IL-2	MCP-1	CNTF
IL-4	MIP-3alpha	GM-CSF
IL-6		PDGF-AA
IL-10		VEGF
IL-13		
TNF-alpha		

Elementos identificáveis no teste (RayBio® C-Series Rat Cytokine Antibody Array C2. RayBiotech, Inc, GA, USA.) escolhidos para as análises da expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em tecidos de ratos, nos diferentes grupos experimentais realizados.

3.7. Análise estatística

Foram realizadas análises estatísticas entre o grupo controle normal (GN) e grupos experimentais, TLT padrão e TTT padrão (P e D), assim como entre os grupos experimentais TLT padrão e TTT padrão (P e D), em todas as datas cirúrgicas, com vistas à indicar possíveis diferenças significativas de intensidade de expressão entre os grupos nas respectivas categorias de proteínas estudadas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. O teste estatístico foi aplicado sobre os resultados numéricos do painel de quimioluminescência, no qual a membrana contendo as amostras apresenta o valor de intensidade de expressão de cada proteína através de marcações específicas em duplicata (n=2). Para tanto foi aplicado o teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas. Adotamos como nível de significância $p \leq 0,05$. Estatística descritiva em caráter qualitativo foi utilizada para descrever e comparar os grupos com tubos fechados (TLT F-P, TLT F-D, TTT F-P e TTT F-D).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise macroscópica

Em ambos os grupos TLT e TTT, exceto nos grupos com tubo fechado (proximais e distais), todos os animais no tempo de 24 horas pós-cirurgia apresentaram crescimento de um fino cabo de regeneração oriundo do coto proximal que atingiu a porção distal. Todos os animais nos tempos de 96 horas e 8 dias apresentaram crescimento de um cabo de regeneração mais calibroso e bem desenvolvido, oriundo do coto proximal que atingiu a porção distal. Todos os animais dos grupos com tubo fechado apresentaram crescimento de cone de regeneração visível, tanto látero-terminal quanto término-terminal.

4.2. Análise de citocinas por quimioluminescência

4.2.1. Nervo normal

O nervo fibular comum do grupo normal (GN) apresentou expressão de todas as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento investigados no presente estudo (Tabela 4).

4.2.2. Tubulização látero-terminal (TLT)

Em 24 horas pós-cirurgia, o grupo TLT padrão apresentou expressão de todas as proteínas (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) investigadas no presente estudo, com exceção do fator de crescimento CNTF, sendo mais evidente a expressão da citocina TNF-alpha, e das quimiocinas CINC-2alpha, LIX e MCP-1 (Tabela 5).

Tabela 4. Valores numéricos de intensidade de expressão no GN

CITOCINA	Intensidade de expressão	QUIMIOCINA	Intensidade de expressão	FATOR DE CRESCIMENTO	Intensidade de expressão
IFN-gamma	0,05±0,03	CINC-1	0,07±0,05	Activin A	0,06±0,04
IL1-alpha	0,08±0,06	CINC-2alpha	0,05±0,04	NGF-beta	0,10±0,07
IL1-beta	0,05±0,03	LIX	0,08±0,06	CNTF	0,03±0,03
IL-2	0,06±0,04	MCP-1	0,09±0,06	GM-CSF	0,07±0,04
IL-4	0,06±0,04	MIP-3alpha	0,08±0,05	PDGF-AA	0,06±0,04
IL-6	0,05±0,03			VEGF	0,06±0,03
IL-10	0,05±0,03				
IL-13	0,04±0,02				
TNF-alpha	0,06±0,04				

Valores representados através de média e desvio padrão.

GN = grupo normal

Tabela 5. Valores numéricos de intensidade de expressão no grupo TLT padrão em 24 horas após a cirurgia

CITOCINA	Intensidade de expressão	QUIMIOCINA	Intensidade de expressão	FATOR DE CRESCIMENTO	Intensidade de expressão
IFN-gamma	0,04±0,03	CINC-1	0,06±0,05	Activin A	0,04±0,03
IL1-alpha	0,06±0,05	CINC-2alpha	0,08±0,07	NGF-beta	0,03±0,03
IL1-beta	0,04±0,03	LIX	0,07±0,06	CNTF	0
IL-2	0,06±0,05	MCP-1	0,08±0,07	GM-CSF	0,05±0,04
IL-4	0,04±0,03	MIP-3alpha	0,04±0,04	PDGF-AA	0,04±0,03
IL-6	0,03±0,02			VEGF	0,06±0,03
IL-10	0,02±0,02				
IL-13	0,03±0,02				
TNF-alpha	0,07±0,06				

Valores representados através de média e desvio padrão.

TLT = tubulização látero-terminal

Em 96 horas pós-cirurgia, o grupo TLT padrão apresentou expressão de todas as proteínas identificáveis no teste, sendo mais evidente a expressão das citocinas IL1-alpha, IL1-beta, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF-alpha, das quimiocinas CINC-1, CINC-2alpha, LIX e MCP-1, e dos fatores de crescimento Activin A, NGF-beta, CNTF, PDGF-AA e VEGF (Tabela 6).

Tabela 6. Valores numéricos de intensidade de expressão no grupo TLT padrão 96 horas após a cirurgia

CITOCINA	Intensidade de expressão	QUIMIOCINA	Intensidade de expressão	FATOR DE CRESCIMENTO	Intensidade de expressão
IFN-gamma	0,04±0,01	CINC-1	0,19±0,10	Activin A	0,19±0,09
IL1-alpha	0,08±0,04	CINC-2alpha	0,18±0,09	NGF-beta	0,10±0,04
IL1-beta	0,07±0,03	LIX	0,14±0,07	CNTF	0,15±0,05
IL-2	0,06±0,03	MCP-1	0,09±0,04	GM-CSF	0,03±0,01
IL-4	0,11±0,04	MIP-3alpha	0,06±0,02	PDGF-AA	0,08±0,03
IL-6	0,24±0,08			VEGF	0,10±0,05
IL-10	0,21±0,08				
IL-13	0,04±0,02				
TNF-alpha	0,09±0,04				

Valores representados através de média e desvio padrão.

TLT = tubulização látero-terminal

No tempo de 8 dias pós-cirurgia, o grupo TLT padrão apresentou expressão reduzida de todas as proteínas identificáveis no kit (com exceção da TNF-alpha que não mostrou expressão) – em comparação com os tempos anteriores – sendo ligeiramente superior a expressão da citocina IL-10, e das quimiocinas LIX e MCP-1 (Tabela 7).

A figura 10 mostra o comparativo visual da distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento entre os grupos GN e TLT em todos os tempos pós-operatórios.

Tabela 7. Valores numéricos de intensidade de expressão no grupo TLT padrão 8 dias após a cirurgia

CITOCINA	Intensidade de expressão	QUIMIOCINA	Intensidade de expressão	FATOR DE CRESCIMENTO	Intensidade de expressão
IFN-gamma	0,02±0,14	CINC-1	0,02±0,19	Activin A	0,03±0,12
IL1-alpha	0,04±0,48	CINC-2alpha	0,04±0,34	NGF-beta	0,01±0,20
IL1-beta	0,02±0,22	LIX	0,05±0,26	CNTF	0,04±0,02
IL-2	0,01±0,07	MCP-1	0,05±0,28	GM-CSF	0,04±0,10
IL-4	0,02±0,16	MIP-3alpha	0,03±0,13	PDGF-AA	0,03±0,13
IL-6	0,04±0,25			VEGF	0,02±0,15
IL-10	0,05±0,08				
IL-13	0,03±0,10				
TNF-alpha	0				

Valores representados através de média e desvio padrão.

TLT = tubulização látero-terminal

Figura 10. Distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão das citocinas (A), quimiocinas (B) e fatores de crescimento (C) do grupo TLT padrão ao longo dos tempos de 24h, 96h e 8 dias, em comparação ao grupo normal. Dados numéricos das citocinas individualmente não foram submetidos à análise estatística. TLT = tubulização látero-terminal.

4.2.3. Tubulização término-terminal (TTT)

No tempo de 24 horas pós-cirurgia, o grupo TTT padrão (cone P) apresentou expressão de todas as proteínas identificáveis no teste, sendo mais evidente a expressão da quimiocina CINC-2alpha. O grupo TTT padrão (cone D) não apresentou expressão das proteínas investigadas na referida data (Tabela 8).

No tempo de 96 horas pós-cirurgia, o grupo TTT padrão P apresentou expressão de todas as proteínas identificáveis no teste, sendo mais evidente a expressão das citocinas IL1-alpha, IL1-beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e TNF-alpha, e da quimiocina CINC-2alpha. O grupo TTT padrão D apresentou expressão mínima ou não apresentou expressão das proteínas investigadas na referida data (Tabela 9).

No tempo de 8 dias pós-cirurgia, o grupo TTT padrão P apresentou expressão reduzida de todas as proteínas identificáveis no teste, sendo mais evidente a expressão do fator de crescimento CNTF. O grupo TTT padrão D apresentou expressão mínima ou não apresentou expressão das proteínas investigadas na referida data (Tabela 10).

A figura 11 mostra o comparativo visual da distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento entre os grupos GN e TTT padrão P e D em todos os tempos pós-operatórios.

Tabela 8. Valores numéricos de intensidade de expressão nos grupos TTT padrão P e TTT padrão D em 24 horas após a cirurgia

CITOCINA	Intensidade de expressão	QUIMIOCINA	Intensidade de expressão	FATOR DE CRESCIMENTO	Intensidade de expressão
IFN-gamma	P 0,03±0,02 D 0	CINC-1	P 0,05±0,03 D 0	Activin A	P 0,04±0,02 D 0
IL1-alpha	P 0,06±0,04 D 0	CINC-2alpha	P 0,12±0,09 D 0	NGF-beta	P 0,04±0,03 D 0
IL1-beta	P 0,03±0,02 D 0	LIX	P 0,05±0,04 D 0	CNTF	P 0,02±0,01 D 0
IL-2	P 0,04±0,02 D 0	MCP-1	P 0,05±0,03 D 0	GM-CSF	P 0,05±0,03 D 0
IL-4	P 0,03±0,02 D 0	MIP-3alpha	P 0,04±0,02 D 0	PDGF-AA	P 0,03±0,02 D 0
IL-6	P 0,02±0,01 D 0			VEGF	P 0,04±0,02 D 0
IL-10	P 0,02±0,01 D 0				
IL-13	P 0,02±0,01 D 0				
TNF-alpha	P 0,05±0,04 D 0				

Valores representados através de média e desvio padrão.

TTT = tubulização término-terminal. P = proximal, D = distal.

Tabela 9. Valores numéricos de intensidade de expressão nos grupos TTT padrão P e TTT padrão D em 96 horas após a cirurgia

CITOCINA	Intensidade de expressão	QUIMIOCINA	Intensidade de expressão	FATOR DE CRESCIMENTO	Intensidade de expressão
IFN-gamma	P 0,05±0,03 D 0	CINC-1	P 0,05±0,03 D 0,01±0,03	Activin A	P 0,04±0,02 D 0
IL1-alpha	P 0,09±0,06 D 0	CINC-2alpha	P 0,12±0,09 D 0	NGF-beta	P 0,04±0,03 D 0
IL1-beta	P 0,11±0,05 D 0	LIX	P 0,05±0,04 D 0	CNTF	P 0,02±0,01 D 0
IL-2	P 0,08±0,05 D 0,01±0,00	MCP-1	P 0,05±0,03 D 0	GM-CSF	P 0,05±0,03 D 0
IL-4	P 0,12±0,06 D 0,02±0,01	MIP-3alpha	P 0,04±0,02 D 0	PDGF-AA	P 0,03±0,02 D 0
IL-6	P 0,16±0,07 D 0,04±0,02			VEGF	P 0,04±0,02 D 0
IL-10	P 0,14±0,08 D 0,04±0,02				
IL-13	P 0,08±0,03 D 0,01±0,00				
TNF-alpha	P 0,13±0,05 D 0,02±0,01				

Valores representados através de média e desvio padrão.

TTT = tubulização término-terminal. P = proximal, D = distal.

Tabela 10. Valores numéricos de intensidade de expressão nos grupos TTT padrão P e TTT padrão D em 8 dias após a cirurgia

CITOCINA	Intensidade de expressão	QUIMIOCINA	Intensidade de expressão	FATOR DE CRESCIMENTO	Intensidade de expressão
IFN-gamma	P 0,02±0,04 D 0	CINC-1	P 0,03±0,06 D 0,01±0,03	Activin A	P 0,02±0,03 D 0
IL1-alpha	P 0,04±0,08 D 0	CINC-2alpha	P 0,02±0,03 D 0	NGF-beta	P 0,02±0,02 D 0
IL1-beta	P 0,04±0,09 D 0	LIX	P 0,03±0,05 D 0	CNTF	P 0,09±0,21 D 0,01±0,00
IL-2	P 0,06±0,25 D 0,03±0,07	MCP-1	P 0,03±0,04 D 0	GM-CSF	P 0,03±0,06 D 0
IL-4	P 0,01±0,00 D 0	MIP-3alpha	P 0,02±0,02 D 0	PDGF-AA	P 0,03±0,03 D 0
IL-6	P 0,04±0,04 D 0			VEGF	P 0,03±0,03 D 0,04±0,06
IL-10	P 0,04±0,02 D 0,01±0,02				
IL-13	P 0,05±0,05 D 0,02±0,01				
TNF-alpha	P 0,02±0,10 D 0				

Valores representados através de média e desvio padrão.

TTT = tubulização término-terminal. P = proximal, D = distal.

Figura 11. Distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão das citocinas (A e D), quimiocinas (B e E) e fatores de crescimento (C e F) dos grupos TTT padrão P (à esquerda) e TTT padrão D (à direita) ao longo dos tempos de 24h, 96h e 8 dias, em comparação ao grupo normal. Dados numéricos das citocinas individualmente não foram submetidos à análise estatística. TTT = tubulização término-terminal. P = proximal, D = distal.

4.2.4. Grupos fechados

– PROXIMAIS

O grupo TLT fechado na porção proximal (TLT F-P) apresentou expressão de todas as proteínas estudadas no tempo de 24 horas pós-cirurgia, sendo mais evidente a expressão das quimiocinas CINC-1, LIX, MCP-1, e dos fatores de crescimento NGF-beta e GM-CSF. Em 96 horas pós-cirurgia houve expressão de todas as proteínas identificáveis no kit com exceção das citocinas IFN-gamma e IL1-alpha, das quimiocinas LIX e MCP-1 e dos fatores de crescimento Activin A, GM-CSF e VEGF (que não apresentaram expressão) sendo mais evidente a expressão da citocina IL-13 e do fator de crescimento CNTF. Em 8 dias, o grupo TLT F-P apresentou expressão mínima ou não apresentou expressão das proteínas investigadas (Tabela 11).

O grupo TTT fechado na porção proximal (TTT F-P) apresentou expressão de todas as proteínas estudadas no tempo de 24 horas pós-cirurgia, sendo mais evidente a expressão das citocinas IL1-alpha, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF-alpha, de todas as quimiocinas e dos fatores de crescimento NGF-beta, GM-CSF, PDGF-AA e VEGF. Nos tempos de 96 horas e 8 dias o grupo TTT F-P apresentou expressão mínima ou não apresentou expressão das proteínas investigadas (Tabela 12).

A figura 12 mostra o comparativo visual da distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento entre os grupos GN, TLT F-P e TTT F-P em todos os tempos pós-operatórios.

– DISTAIS

Em todos os tempos estudados, ambos os grupos fechados na porção distal, TLT F-D e TTT F-D, apresentaram expressão mínima ou não apresentaram expressão das proteínas investigadas. Devido aos dois referidos grupos serem tecnicamente iguais (rever Figura 4), os dados numéricos são os mesmos para ambos (Tabela 13).

A figura 13 mostra o comparativo visual da distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento entre os grupos GN, TLT F-D e TTT F-D em todos os tempos pós-operatórios.

Tabela 11. Valores numéricos de intensidade de expressão no grupo TLT F-P em 24 horas, 96 horas e 8 dias

CITOCINA	Intensidade de expressão			QUIMIOCINA	Intensidade de expressão			FATOR DE CRESCIMENTO	Intensidade de expressão		
	24h	96h	8d		24h	96h	8d		24h	96h	8d
IFN-gamma	0,04±0,02	0	0	CINC-1	0,07±0,04	0,03±0,01	0,01±0,01	Activin A	0,05±0,03	0	0
IL1-alpha	0,06±0,04	0	0,01±0,02	CINC-2alpha	0,04±0,03	0,03±0,00	0,02±0,03	NGF-beta	0,09±0,05	0,01±0,00	0,01±0,01
IL1-beta	0,04±0,03	0,01±0,00	0	LIX	0,09±0,04	0	0,01±0,01	CNTF	0,01±0,01	0,07±0,02	0,03±0,01
IL-2	0,06±0,02	0,02±0,00	0	MCP-1	0,07±0,04	0	0	GM-CSF	0,07±0,04	0	0
IL-4	0,05±0,02	0,03±0,01	0,01±0,01	MIP-3alpha	0,06±0,03	0,01±0,00	0	PDGF-AA	0,04±0,02	0,01±0,00	0,01±0,01
IL-6	0,03±0,01	0,05±0,01	0,02±0,01					VEGF	0,06±0,04	0	0,01±0,00
IL-10	0,01±0,01	0,06±0,01	0,03±0,04								
IL-13	0,03±0,02	0,12±0,15	0,01±0,00								
TNF-alpha	0,06±0,04	0,01±0,00	0,01±0,00								

Valores representados através de média e desvio padrão.

TLT = tubulização látero-terminal. FP = fechado proximal.

Tabela 12. Valores numéricos de intensidade de expressão no grupo TTT F-P em 24 horas, 96 horas e 8 dias

CITOCINA	Intensidade de expressão			QUIMIOCINA	Intensidade de expressão			FATOR DE CRESCIMENTO	Intensidade de expressão		
	24h	96h	8d		24h	96h	8d		24h	96h	8d
IFN-gamma	0,08±0,06	0	0	CINC-1	0,17±0,11	0	0	Activin A	0,08±0,06	0	0
IL1-alpha	0,11±0,09	0	0	CINC-2alpha	0,12±0,08	0	0	NGF-beta	0,16±0,11	0	0
IL1-beta	0,08±0,06	0	0	LIX	0,13±0,09	0	0	CNTF	0,08±0,04	0	0
IL-2	0,12±0,08	0	0	MCP-1	0,12±0,09	0	0	GM-CSF	0,10±0,07	0	0
IL-4	0,12±0,09	0	0	MIP-3alpha	0,10±0,08	0,01±0,01	0	PDGF-AA	0,10±0,06	0	0
IL-6	0,10±0,06	0	0					VEGF	0,10±0,07	0,01±0,02	0
IL-10	0,09±0,06	0	0								
IL-13	0,07±0,04	0,01±0,01	0,01±0,01								
TNF-alpha	0,10±0,09	0,02±0,01	0								

Valores representados através de média e desvio padrão.

TTT = tubulização término-terminal. FP = fechado proximal.

Tabela 13. Valores numéricos de intensidade de expressão nos grupos com tubo fechado na porção distal, TLT F-D e TTT F-D em 24 horas, 96 horas e 8 dias

CITOCINA	Intensidade de expressão			QUIMIOCINA	Intensidade de expressão			FATOR DE CRESCIMENTO	Intensidade de expressão		
	24h	96h	8d		24h	96h	8d		24h	96h	8d
IFN-gamma	0	0	0	CINC-1	0	0	0	Activin A	0	0,01±0,01	0,01±0,01
IL1-alpha	0	0	0	CINC-2alpha	0	0,02±0,01	0,01±0,01	NGF-beta	0	0	0
IL1-beta	0	0	0	LIX	0	0,03±0,02	0,01±0,03	CNTF	0,01±0,01	0,04±0,09	0
IL-2	0	0	0	MCP-1	0	0	0	GM-CSF	0	0,01±0,00	0
IL-4	0	0	0	MIP-3alpha	0	0	0	PDGF-AA	0	0	0
IL-6	0	0,03±0,05	0,02±0,03					VEGF	0	0,04±0,04	0,03±0,03
IL-10	0	0	0								
IL-13	0	0,04±0,01	0,03±0,01								
TNF-alpha	0	0	0								

Valores representados através de média e desvio padrão.

TLT = tubulização látero-terminal. TTT = tubulização término-terminal. FD = fechado distal.

Figura 12. Distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão das citocinas (A, D), quimiocinas (B, E) e fatores de crescimento (C, F) dos grupos fechados na porção proximal, TLT F-P (A, B, C) e TTT F-P (D, E, F) ao longo dos tempos de 24h, 96h e 8 dias, em comparação ao grupo normal. Dados numéricos das citocinas individualmente não foram submetidos à análise estatística. TLT = tubulização látero-terminal. TTT = tubulização término-terminal. FP = fechado proximal.

Figura 13. Distribuição sequencial das médias de intensidade de expressão das citocinas (A), quimiocinas (B) e fatores de crescimento (C) dos grupos fechados na porção distal, TLT F-D e TTT F-D ao longo dos tempos de 24h, 96h e 8 dias, em comparação ao grupo normal. Dados numéricos das citocinas individualmente não foram submetidos à análise estatística.

TLT = tubulização látero-terminal. TTT = tubulização término-terminal. F-D = fechado distal.

4.3. Expressão sequencial entre grupos

4.3.1. Citocinas

Ao comparar a expressão média do conjunto de citocinas do GN em relação ao conjunto de citocinas dos grupos TLT padrão, TTT padrão P e TTT padrão D, o GN apresentou valores superiores estatisticamente significativos aos grupos TLT em 24h e 8 dias, TTT padrão P em 24h e 8 dias, e TTT padrão D em 24h, 96h e 8 dias, com *p value* variando de 0,02 a 0,008. Exceto o grupo TTT padrão P em 96h que apresentou valor estatisticamente superior ao GN ($p=0,01$).

A expressão média do conjunto de citocinas do TLT padrão em comparação ao conjunto de citocinas dos grupos TTT padrão P e TTT padrão D, teve valor significativamente superior a ambos os grupos TTT no tempo de 24h, e ao TTT padrão D em 96h, com *p value* variando de 0,04 a 0,008 (Figura 14).

Figura 14. Expressão sequencial do conjunto de citocinas entre os grupos normal (GN), tubulização látero-terminal (TLT padrão), tubulização término-terminal coto proximal (TTT padrão P) e tubulização término-terminal coto distal (TTT padrão D) nos tempos de 24 horas, 96 horas e 8 dias pós-cirurgia. Valores representados através de média e desvio padrão. Asterisco azul = representa valor significativamente superior do GN em relação aos respectivos experimentais. Asterisco vermelho = representa valor significativamente superior de grupo experimental em relação ao GN. Triângulo verde = representa valor significativamente superior do grupo TLT em relação aos TTTs.

4.3.2. Quimiocinas

Ao comparar a expressão média do conjunto de quimiocinas do GN ao conjunto de quimiocinas dos grupos TLT padrão, TTT padrão P e TTT padrão D, o GN apresentou valores superiores estatisticamente significativos aos grupos: TLT em 8 dias, TTT padrão P em 8 dias, e TTT padrão D em 24h, 96h e 8 dias, com $p=0,04$. Exceto o grupo TTT padrão P em 96h que apresentou valor estatisticamente superior ao GN ($p=0,04$).

Entre os grupos TLT e TTT padrão D, em todos os tempos, o grupo TLT apresentou valores superiores estatisticamente significativos, com $p=0,04$. Os demais grupos não apresentaram valores com diferença significativa (Figura 15).

Figura 15. Expressão sequencial do conjunto de quimiocinas entre os grupos normal (GN), tubulização látero-terminal (TLT padrão), tubulização término-terminal coto proximal (TTT padrão P) e tubulização término-terminal coto distal (TTT padrão D) nos tempos de 24 horas, 96 horas e 8 dias pós-cirurgia. Valores representados através de média e desvio padrão. Asterisco azul = representa valor significativamente superior do GN em relação aos respectivos experimentais. Asterisco vermelho = representa valor significativamente superior de grupo experimental em relação ao GN. Triângulo verde = representa valor significativamente superior do grupo TLT em relação aos TTTs.

4.3.3. Fatores de crescimento

Ao comparar a expressão média do conjunto de fatores de crescimento do GN ao conjunto de fatores de crescimento dos grupos TLT padrão, TTT padrão P e TTT padrão D, o GN apresentou valores superiores estatisticamente significativos aos grupos TLT em 24h e 8 dias, TTT padrão P em 24h, e TTT padrão D em 24h, 96h e 8 dias, com *p value* variando de 0,03 a 0,05.

Entre os grupos TLT e TTT padrão D, nos tempos de 24h e 96h, o grupo TLT apresentou valores superiores estatisticamente significativos ao grupo TTT padrão D, com $p=0,03$. Os demais grupos não apresentaram valores com diferença significativa (Figura 16).

Figura 16. Expressão sequencial do conjunto de fatores de crescimento entre os grupos normal (GN), tubulização látero-terminal (TLT padrão), tubulização término-terminal coto proximal (TTT padrão P) e tubulização término-terminal coto distal (TTT padrão D) nos tempos de 24 horas, 96 horas e 8 dias pós-cirurgia. Valores representados através de média e desvio padrão. Asterisco azul = representa valor significativamente superior do GN em relação aos respectivos experimentais. Triângulo verde = representa valor significativamente superior do grupo TLT em relação aos TTTS.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Após lesão de nervo, para que haja uma regeneração tissular bem-sucedida, o controle da resposta inflamatória no microambiente regenerativo tem se mostrado como sendo um fator primordial para se obter resultados satisfatórios. Resposta essa que inclui evento celulares, mas principalmente moleculares. Estudos sequenciais destes eventos moleculares que ocorrem no processo de crescimento de nervo ainda são escassos. O presente estudo investigou se há diferença no perfil molecular da resposta imune no processo de regeneração de nervo entre duas técnicas microcirúrgicas de reparo: a tubulização látero-terminal (TLT) e a tubulização término-terminal (TTT). Como o grupo TTT padrão D apresentou expressão mínima ou não apresentou expressão dos componentes moleculares analisados, iremos nos referir às comparações com foco entre os grupos TLT padrão e TTT padrão P.

Foi visto que o perfil molecular difere entre as duas técnicas, principalmente no que se diz respeito à primeira fase da DW. No grupo TLT, houve maior número de elementos expressos nas primeiras 24h em comparação ao grupo TTT. Isso possivelmente se deve, inicialmente, ao fato de que, por acoplarmos o tubo de silicone ao nervo tibial sem a realização de nenhuma janela epi-perineural, ou seja, sem haver lesão no nervo doador, os brotamentos axonais do grupo látero-terminal devem conseguir transpor as barreiras conjuntivas do nervo (epineuro e perineuro), para então iniciar seu crescimento e atingir o coto distal. Dado que corrobora com esse processo é a expressão da enzima MMP-8 que mostrou-se superior no grupo TLT em comparação ao TTT (dados não detalhados no estudo). Por estarem principalmente envolvidas na degradação dos componentes da MEC, as MMPs foram abordadas em estudos prévios que indicaram aumento de sua expressão em lesões de nervo após esmagamento (LA FLEUR et al., 1996; KHERIF et al., 1998; SHUBAYEV, MYERS, 2000), axotomia (KHERIF et al., 1998; SIEBERT et al., 2001; HUGHES et al., 2002) além de estudo in vitro (FERGUSON, MUIR, 2000). Dentre as proteínas identificáveis no teste comercial utilizado no presente estudo, há a presença de uma das representantes das metaloproteinases de matriz, a MMP-8, que mostrou-se efetivamente expressa tanto na técnica látero-terminal quanto na término-terminal, sendo maior sua expressão na TLT. A MMP-8, também conhecida como collagenase de neutrófilos, é uma enzima capaz de degradar colágenos fibrilares mais resistentes à proteólise (WHITTAKER et al., 1999). Podemos sugerir então que a maior intensidade de expressão da MMP-8 vista no grupo

TLT (em comparação com o TTT padrão P) se deva à necessidade de ação das metaloproteinases de abrirem caminho para que os neuritos em profusão a partir da lateral do nervo doador intacto transpassem as membranas conjuntivas do nervo e atinjam o coto distal do nervo seccionado, sendo que no presente estudo não realizamos janelas epineurais, e além de que, estudos anteriores abordaram sobre a necessidade de absorção dessas barreiras para que ocorra o brotamento axonal colateral (ZHANG, FISCHER, 2002; LYKISSAS et al., 2007).

Na presente tese, investigamos os elementos moleculares presentes apenas no blastema de regeneração formado nos cotos proximal e distal do nervo fibular (quando TTT), e lateralmente no tibial (quando TLT). Entretanto, há a possibilidade de vários dos elementos estudados estarem presentes também no fluido extracorpóreo presente no interior do tubo de silicone, e não apenas nos cotos. Segundo a literatura, após ruptura total de um nervo e introdução dos cotos proximal e distal em tubos de silicone, um líquido amarelo claro se acumula a partir das extremidades e em poucas horas o tubo é preenchido por inteiro (LONGO et al., 1983a; WILLIAMS, VARON, 1985). Esse fluido, secretado pelos cotos proximal e distal, que é composto por soro sanguíneo e fluidos intra e extracelulares, embebe e une as extremidades do nervo seccionado (LONGO et al., 1983b; WILLIAMS et al., 1983). Com intuito de promover a regeneração do nervo, fatores difusíveis são sintetizados e liberados pelo coto distal, assim como fatores neurotróficos liberados por células não neurais presentes no sítio da lesão. Essa gama de fatores de crescimento acumulados no líquido presente dentro do tubo auxilia e induz o processo regenerativo (LONGO et al., 1983a,b; FIELDS et al., 1989). Esse fluido extracelular atua então como um meio funcional que ampara os componentes celulares e a profusão axonal dentro do sistema fechado do conduto tubular (LI et al., 2016). Trabalho recente analisou o fluido contido no interior de tubos de silicone com intuito de investigar a presença e influência de integrantes do sistema complemento na regeneração de nervo. Os resultados indicaram que os elementos contidos no fluido influenciaram no microambiente regenerativo (LI et al., 2016). Essa análise, do fluido corporal secretado e contido no interior do tubo, poderia alterar os resultados referentes ao padrão molecular aqui discutidos. Estudos posteriores do fluido podem vir a ser realizados para complementar nossos achados, uma vez que os fluidos referentes aos grupos realizados foram previamente armazenados para análises futuras.

5.1. Grupos fechados

Todos os grupos com tubo fechado na porção distal (TLT F-D e TTT F-D) apresentaram expressão mínima ou mesmo não apresentaram expressão de nenhum dos elementos identificáveis no teste. Em relação aos grupos distais fechados, esse resultado, ao menos em partes, já era esperado, pois a princípio o conduto fechado na porção distal de um nervo seccionado transforma o grupo em um controle negativo ou desnervado, que pode ser obtido, como já realizado em trabalhos anteriores com técnicas similares, através da oclusão da porção distal, evitando a reinervação através de sua sutura na musculatura (NOAH et al., 1997; MATSUMOTO et al., 1999; JABERI et al., 2003; AKEDA et al., 2006; VITERBO et al., 2017), em si mesmo (ZHAO, Z CHEN, T CHEN, 1997), na pele (ZHAO, Z CHEN, T CHEN, 1997; ZHANG et al., 2006) ou confinado em materiais diversos (GOHEEN-ROBILLARD et al., 2002; ZUIJDENDORP et al., 2010).

Ao comparar os grupos fechados na porção proximal (TLT F-P e TTT F-P) em 24h pós-cirurgia, o grupo TLT F-P apresentou expressão similar ou inferior ao grupo normal, enquanto que, inversamente no grupo TTT F-P, houve evidente aumento da expressão de todos os elementos estudados (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento). Nos tempos de 96h e 8 dias, ambos os grupos apresentaram diminuição da intensidade de expressão de todos os fatores estudados, retornando a níveis basais ou inferiores. O presente estudo põe em evidência a hipótese de que, no tempo de 24h, não houve expressão no grupo TLT F-P por não haver lesão no nervo doador, assim como por não haver estímulo neurotrópico proveniente da sinalização de um coto distal lesionado. Já o grupo TTT F-P em 24h apresentou elevada expressão devido à descontinuidade do nervo estimulando reações regenerativas no coto proximal. Adicionalmente, a queda da expressão nos tempos experimentais subsequentes em ambos os grupos, dá-se devido aos cotos proximais de ambos os grupos TLT F-P e TTT F-P estarem oclusos e confinados no interior do tubo de silicone selado. Esses resultados reforçam que, após secção de nervo, o coto proximal é dependente do estímulo de fatores neurotróficos liberados pelo coto distal, para dar sequência aos processos degenerativo e regenerativo (SECKEL et al., 1986; LUNDBORG et al., 1994; PFISTER et al., 2007).

5.2. Citocinas

Dentre as citocinas estudadas a que apresentou expressão aumentada no tempo de 24h foi apenas o TNF- α no grupo TLT. Segundo a literatura, embora possua meia-vida curta, o TNF- α é considerado um dos mais potentes mediadores inflamatórios após infecções, traumas ou procedimentos cirúrgicos (CURFS, MEIS, HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997), e nas primeiras horas após lesão de nervos periféricos, a expressão de TNF- α é aumentada (GEORGE, BUEHL, SOMMER, 2004; SHAMASH et al., 2002). Em nosso estudo o TNF- α não mostrou expressão aumentada no grupo TTT dentro de 24h pós-cirurgia, sendo uma possível explicação que, no grupo TTT, devido sua meia-vida curta a expressão do TNF- α ainda viria a apresentar seu pico nos tempos subsequentes ao sacrifício de 24 horas. Em comparação aos níveis normais, nenhuma citocina apresentou expressão elevada no grupo TTT, mantendo-se expressas com intensidade similar ou inferior aos níveis basais.

O tempo de 96 horas pós cirurgia foi o tempo que apresentou maior número e intensidade de expressão dos elementos estudados em ambos os grupos TLT e TTT padrão P, indicando intensa atividade do processo degenerativo nessa fase. Em 96h, o grupo TLT apresentou maior quantidade de representantes das quimiocinas e fatores de crescimento, e menos citocinas do que o grupo TTT padrão P. A explicação possível dá continuidade ao raciocínio inicial, de que o grupo TLT exerça ação mais intensa no processo degenerativo, com maior ativação de células e moléculas, com intuito de romper as barreiras tissulares do nervo doador, inicialmente ao processo de brotamento axonal. No grupo TTT em 96h, houve aumento da expressão de todas as citocinas estudadas, com exceção da IFN- γ . A intensidade de expressão das citocinas IL-6 e IL-10 no grupo TLT foi superior à expressa no grupo TTT. Apesar de sua classificação originalmente inflamatória, a IL-6 é capaz de promover a proliferação de neuritos em gânglios da raiz dorsal (CAO et al., 2006) e contribuir ativamente na regeneração axonal (HIROTA et al., 1996). Esses dados podem elucidar novamente o quadro de intensa ação celular e molecular necessárias na TLT, devido à transposição das barreiras, e não tão intensas na TTT, na qual a completa ruptura dos tecidos nervosos não requer maiores esforços para limpeza de detritos da lesão. A maior expressão da IL-10 na TLT em comparação a TTT, pode ser explicada pela presença ou não da citocina IL-13, a qual não teve aumento de expressão na TLT enquanto apresentou expressão elevada na TTT. Segundo a literatura, a ação da IL-10 pode ser comprometida pela ação de outras citocinas, como IL-4, IL-13

e IFN- γ , além de sua própria autorregulação (LIN, CALVANO, LOWRY, 2000; ZHANG, AN, 2007; RAEBURN et al., 2002). Sendo assim, possivelmente devido à não influência da IL-13 no grupo TLT, a IL-10 teve seus níveis elevados. Além disso, por ser classificada como citocina anti-inflamatória, a IL-10 atua inibindo e controlando a ação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α e IL-1 (LIN, CALVANO, LOWRY, 2000; ZHANG, AN, 2007; RAEBURN et al., 2002). Esse dado corrobora com nossos achados, nos quais a expressão das citocinas IL-1 α , IL-1 β e TNF- α encontram-se menos expressas no grupo TLT, que apresentou maior expressão de IL-10, em comparação com as mesmas citocinas expressas no TTT.

Aos 8 dias pós-cirurgia, houve evidente redução da expressão das citocinas em ambos os grupos, TLT e TTT. Partindo dos valores numéricos de intensidade de expressão, podemos sugerir que a expressão das citocinas no tempo de 8 dias retornaram aos valores basais, com valores similares ou iguais aos do GN, ou mesmo inferiores. Na fase final da DW, os macrófagos passam a liberar citocinas anti-inflamatórias após migrarem para um fenótipo anti-inflamatório conhecido como M2. Esses macrófagos, agora M2, assumem papel citoprotetor, promovendo angiogênese, proteção das células circundantes e cicatrização tecidual (SICA et al., 2006; CHEN, PIAO, BONALDO, 2015; SIDDIQUI, LIVELY, SCHLICHTER, 2016). A secreção de IL-10 só aumenta significativamente no momento em que macrófagos hematógenos recrutados atingem o fragmento distal do nervo lesionado, atingindo seu pico de expressão por volta do 7º dia pós-lesão (BE'ERI et al., 1998; ROTSHENKER, 2011). Após essa data, a citocina IL-10 apresenta-se em quantidade aumentada enquanto, simultaneamente, a ação pró-inflamatória de outras moléculas é reduzida. Consequentemente, a ação de células de Schwann e macrófagos ativados são diminutos, sinalizando assim o final do processo inflamatório em resposta à lesão (BE'ERI et al., 1998; MIRSKI et al., 2003). Segundo estudo prévio, ao longo dos primeiros sete dias após lesão, no coto distal do nervo seccionado, os macrófagos recrutados tornam-se mais numerosos, a expressão de TNF- α e IL-1 β diminui e inversamente, é aumentada a expressão da IL-10 (GOLZ, et al., 2006). Na presente investigação, no tempo de 8 dias, identificamos que houve evidente redução da expressão de moléculas sinalizadoras pró-inflamatórias, contudo, inversão do perfil molecular, com aumento de proteínas anti-inflamatórias, não foi visualizada. A pequena expressão de IL-10 no tempo de 8 dias, no presente estudo, pode ser devido a sua meia-vida limitada, de alguns poucos minutos à algumas horas (ROTSHENKER, 2011), ou mesmo que, o processo regenerativo referente as técnicas microcirúrgicas aqui

empregadas, inicie-se em tempo superior à 8 dias pós-lesão. Nossos resultados podem sugerir então, que análises realizadas em tempos posteriores a 8 dias pós-lesão indicaria o final do processo inflamatório e início do processo regenerativo, com uma provável inversão do perfil molecular, de pró-inflamatório para anti-inflamatório. Análises complementares são necessárias e demandarão estudos futuros voltados para enriquecer o entendimento dos mecanismos de ação moleculares envolvidos na regeneração do nervo periférico.

5.3. Quimiocinas

As quimiocinas são citocinas com propriedade quimiotáticas, sendo capazes de atuar em células distantes do local no qual foram produzidas ou encontram-se presentes, recrutando à distância populações distintas de células inflamatórias para atuarem nos sítios de inflamação (GUERREIRO, SANTOS-COSTA, AZEVEDO-PEREIRA, 2011, OLIVEIRA et al., 2011).

No tempo de 24 horas pós-lesão de nervo, as quimiocinas mais evidentemente expressas no grupo TLT foram a CINC-2 α , LIX e MCP-1, enquanto na TTT houve aumento de expressão apenas da CINC-2 α , contudo, expressão essa maior do que no grupo TLT. As quimiocinas CINC-2 α e LIX atuam principalmente no recrutamento de neutrófilos, enquanto a MCP-1 está associada à ativação e resposta de monócitos (KOLTSOVA, LEY, 2010; ALZOGHAIBI, ZUBAIDI, 2014). Podemos inferir então, que a menor expressão de CINC-2 α no grupo TLT, em comparação ao TTT, deva ao fato de que os outros elementos expressos atuem com funções similares e conjuntamente no recrutamento de neutrófilos e monócitos. Além disso, o maior número de quimiocinas mais evidentemente expressas no grupo TLT (CINC-2 α , LIX e MCP-1), em comparação ao TTT (CINC-2 α), nas quais a principal função é atrair células fagocíticas para o sítio da lesão, deve ocorrer devido a necessidade de que haja fagocitose intensa das camadas conjuntivas do nervo doador intacto, fato abordado anteriormente. Entretanto, em relação ao GN, a expressão das quimiocinas LIX e MCP-1 foi similar a expressão no grupo normal, indicando que nas 24h elas ainda se mantêm em níveis basais.

Também nos chama a atenção que no grupo TLT no tempo de 96h, houve expressão elevada de quatro das cinco quimiocinas estudadas (CINC-1, CINC-2 α , LIX e MCP-1), enquanto no TTT manteve-se evidente a expressão apenas da CINC-2 α , com

mesma intensidade vista em 24h. As quimiocinas CINC-1, CINC-2 α e LIX já se encontravam presentes no grupo TLT em 24h. Em 96h houve um aumento da expressão das referidas quimiocinas, sugerindo que após 3 dias as células que sintetizavam essas proteínas tornaram-se mais numerosas.

A quimiocina MCP-1 tem relação ao recrutamento de macrófagos com importante atuação após lesão de nervo, apresentando pico de expressão de seu mRNA já no primeiro dia após lesão (SIEBERT et al., 2000; SUBANG, RICHARDSON, 2001; PERRIN et al. 2005). No presente estudo, o grupo TLT apresentou aumento da expressão de MCP-1 nos tempos de 24h e 96h, entretanto, em níveis similares referentes à MCP-1 no GN. Após lesão de nervo, a ativação do perfil fagocítico das células de Schwann as leva a aumentar a expressão de citocinas que promovem a infiltração de macrófagos e a regeneração axonal, como o TNF- α , óxido nítrico sintase induzível (iNOS), IL-1 α/β , assim como a MCP-1 (LEE et al. 2009). Sendo assim, podemos inferir que o não aumento da expressão de MCP-1 nos grupos TLT e TTT, seja devido a uma ação compensatória de outras moléculas que estejam desempenhando mesma função, como o TNF- α que apresentou sua expressão elevada em ambos os grupos.

Inicialmente à lesão, com intuito de retomar a homeostase do tecido nervoso, citocinas e quimiocinas apresentam expressão rapidamente aumentada após lesão ou infecção (FREGNAN et al., 2012). A primeira fase da DW está principalmente associada à destruição de detritos de mielina e recrutamento de macrófagos hematógenos, sendo a segunda fase caracterizada pela expressão de citocinas e quimiocinas ligadas a resposta inflamatória local e ativação de células do sistema imune (TASKINEN, RÖYTTÄ, 2000; SHAMASH, REICHERT, ROTSHENKER, 2002). Dentro de uma semana pós-lesão são produzidas moléculas inibidoras de mediadores pró-inflamatórios (ex. IL-1 α/β , TNF- α , IL-6, GM-CSF) (SAADA, REICHERT, ROTSHENKER, 1996; BE'ERI et al., 1998), enquanto que, invertidamente, aumentam os níveis de expressão de citocinas anti-inflamatórias (MIRSKI et al., 2003). Sendo assim, na fase final da DW, os numerosos macrófagos presentes no sítio da lesão passam a liberar citocinas anti-inflamatórias após migrarem de seu fenótipo clássico pró-inflamatório para um fenótipo anti-inflamatório conhecido como M2. Esses macrófagos, agora M2, assumem papel citoprotetor, promovendo angiogênese, proteção das células circundantes e cicatrização tecidual (SICA et al., 2006; CHEN, PIAO, BONALDO, 2015; SIDDIQUI, LIVELY, SCHLICHTER, 2016). Até o momento sabe-se que o mecanismo que induz essa transição fenotípica dos macrófagos de um estágio pró-inflamatório (M1) para anti-inflamatório

(M2) é devido a ação de determinantes moleculares que atuam através de uma gama de sinalizações moleculares, fatores de transcrição, reguladores pós-transcricionais e mecanismos epigenéticos (SICA, MANTOVANI, 2012). Deste modo, a finalização da resposta inflamatória (com a redução das moléculas sinalizadoras pró-inflamatórias) e a eliminação das células fagocitárias na porção distal do nervo lesionado também são requisitos críticos para o sucesso da regeneração (FENRICH, GORDON, 2004).

No presente estudo, em 8 dias pós-cirurgia, todas as quimiocinas de ambos os grupos sofreram diminuição de sua expressão, voltando à níveis basais, similares ou inferiores ao GN, o que nos permite inferir que ambos os grupos TLT e TTT encontravam-se no início do processo regenerativo, corroborando nossos dados com a literatura vigente. Entretanto, confirmação desta hipótese seria possível apenas com análises complementares da identificação da população celular presente no tempo de 8 dias, possivelmente através da marcação e identificação de macrófagos M2 no sítio da lesão (CHEN, PIAO, BONALDO, 2015; JABLONSKI et al., 2015).

5.4. Fatores de crescimento

Com a capacidade de interferir diretamente na sobrevivência e diferenciação de populações neuronais diversas, os fatores neutróficos, ou fatores de crescimento, têm sido extensivamente estudados com base em seus efeitos sobre o crescimento axonal e a sobrevivência neuronal (CHAN et al., 2001; BOYD, GORDON, 2003; BOSSE, 2012).

Quando empregada com intuito de reparar um nervo lesionado, a tubulização oferece um local fechado no qual fatores neurotróficos, sintetizados pelo próprio nervo ou células do sistema imune adjacentes, se acumulam estimulando e facilitando o crescimento axonal (SCHMIDT, LEACH, 2003; BATTISTON et al., 2005). No presente estudo analisamos também os fatores de crescimento presentes após a realização das técnicas TLT e TTT.

No tempo de 24h após secção de nervo, nenhum dos grupos apresentou aumento da expressão de nenhum dos fatores de crescimento estudados. Em 96h, o grupo TLT apresentou aumento evidente da expressão de Activin A, NFG- β , CNTF, PDGF-AA e VEGF, enquanto o grupo TTT apresentou níveis abaixo do basal para todos os fatores. Em 8 dias pós-lesão, no grupo TLT, houve redução da expressão de todos os fatores de crescimento para níveis inferiores aos basais, enquanto no grupo TTT, todos os fatores de

crescimento também apresentaram níveis inferiores aos basais e apenas o CNTF apresentou expressão aumentada.

Foi demonstrado que a Activin A, membro da superfamília do TGF- β , é expressa por neurônios e tem como papel principal a indução da proliferação de células progenitoras neurais, neurogênese e potente ação anti-inflamatória (ABDIPRANOTO-COWLEY et al., 2009; LI, GU, YI, 2017). Adicionalmente, foi demonstrado que a Activin A, além de sua ação primária na derme, possui mecanismo neuroprotetor por promover sobrevivência neuronal após lesão aguda cerebral, como acidente vascular cerebral ou traumatismo craniano (WANKELL et al., 2003). Foi abordado também que os níveis de expressão de Activin A produzidos por queratinócitos e fibroblastos aumentam quando na presença das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α (HUBNER, WERNER, 1996). Em nosso estudo, no grupo TLT, houve aumento expressão de Activin A juntamente ao aumento das citocinas IL-1 β e TNF- α , indicando que nossos resultados condizem com o mecanismo descrito na literatura.

O NGF é a neurotrofina mais amplamente pesquisada por apresentar papel fundamental na regeneração de nervos periféricos (SUN et al., 2009). Estudo utilizando o NGF com intuito de otimizar a regeneração de nervo mostrou que, se liberado de modo controlado dentro de conduto tubular, o NGF apresenta capacidade de promover a regeneração de nervo dentro de 6 semanas, e que essa regeneração, relacionada ao NGF, é dose-dependente (LEE et al., 2003). Segundo estudos prévios, o NGF apresenta um padrão de expressão bifásico, no qual há uma primeira fase em que há aumento de expressão entre 12h a 48h após lesão, seguida por uma queda nos níveis, e uma fase posterior, compreendida entre 36h a 3 semanas, na qual há uma nova elevação dos níveis de expressão que atingem valores 5 vezes maiores que os basais (HEUMANN et al., 1987; MEYER et al., 1992; BOYD, GORDON, 2003). Esses dados se associam aos nossos achados referentes ao aumento da expressão do NGF com subsequente queda.

O CNTF apresenta uma queda nas primeiras 24h após lesão de nervo e após uma semana os níveis estão 5 vezes abaixo. É visto um aumento da expressão em 4 semanas, porém os níveis continuam baixos (ITO et al., 1998). Estudos que realizaram esmagamento e secção de nervo mostraram que após esmagamento os níveis de expressão de mRNA do CNTF inicialmente diminuíram e retornaram ao padrão basal ao longo do processo regenerativo. Já após secção de nervo, os níveis de expressão permaneceram baixos, indicando que a relação axônio-célula de Schwann é crítica para promover a expressão do CNTF (FRIEDMAN et al., 1992; SENDTNER, STÖCKLI, THOENEN,

1992). Na presente tese identificamos o padrão inicial de expressão diminuída ao qual se refere a literatura, mas ao final dos nossos experimentos ainda identificamos valores aumentados de CNTF, possivelmente devido aos grupos estudados não terem ainda alcançado a fase regenerativa subsequente.

As plaquetas são capazes de liberar diversos fatores de crescimento, como os três isômeros do fator de crescimento plaquetário (PDGF $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ e $\alpha\beta$), o VEGF e o TGF- β (SEBBEN, LICHTENFELS, BRAGA DA SILVA, 2011). O PDGF tem sido referido por estimular a mitogênese e quimiotaxia de fibroblastos, células musculares, neutrófilos e macrófagos, inclusive por estimular macrófagos a secretarem outros importantes fatores de crescimento que atuam no processo de cicatrização (SHAH, KEPPLER, RUTKOWSKI, 2014). Além disso, foi mostrado que ele também é responsável por estimular a produção de componentes da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, proteoglicanos e ácido hialurônico (SHIMOKADO et al., 1985). Estudo recente analisou o efeito da administração local do PDGF no reparo de nervo por meio de tubos de silicone. No grupo em que o PDGF foi inserido dentro do tubo, houve aumento significativo do crescimento axonal além de melhor recuperação funcional, em comparação ao grupo com tubo vazio (GOLZADEH, MOHAMMADI, 2016). Em nosso estudo identificamos aumento do PDGF-AA apenas no grupo TLT, podendo indicar que, de acordo com suas funções abordadas nos trechos acima apresentados, que esse aumento se deva ao aumento da intensidade do evento degenerativo necessário na técnica látero-terminal.

O VEGF exerce importantes funções na angiogênese, vasculogênese, assim como na proliferação, migração, e sobrevivência de células endoteliais (SEBBEN et al., 2011). Além de sua atuação primária no tecido vascular, o VEGF atua também no processo de regeneração de nervos, devido a relação intrínseca entre vasos sanguíneos e células nervosas. Quando adicionado à condutos tubulares, o VEGF aumenta o desenvolvimento dos vasos ao longo da regeneração, indicando haver uma interdependência entre os dois processos (HOBSON, GREEN, TERENCE, 2000). Além disso, estudos indicam que em células neuronais o VEGF tem efeito neuroprotetor, neurotrófico, estimulando a proliferação e sobrevivência celular, tanto *in vitro* como *in vivo* (ZACHARY, 2005). Segundo a literatura, após lesão de nervo o VEGF tem sua expressão aumentada com pico em 72h (TANG et al., 2009). Em relação aos eventos regenerativos, estudos prévios investigaram os efeitos do VEGF na regeneração de nervo em ratos *in vivo*. Foram utilizados enxertos pré-tratados com VEGF, NGF ou laminina. Resultados mostraram que os enxertos pré-tratados com VEGF induziram o crescimento de células de Schwann e de

vasos sanguíneos, mas não de axônios, indicando que o VEGF contribui na regeneração através do suporte e estímulo às células de Schwann e neovascularização (SONDELL, LUNDBORG, KANJE, 1999). Em estudo experimental de regeneração de nervo, a aplicação de VEGF dentro de condutos tubulares demonstrou efeito positivo sobre o suprimento celular e vascular dentro de 30 dias, e um aumento significativo da densidade axonal aos 180 dias, em comparação a tubos com apenas Matrigel® em seu interior (HOBSON, 2002).

Parte dos mecanismos de ação ou algum dos mecanismos, referidos no parágrafo anterior, podem vir a explicar as diferenças quanto à expressão dos fatores de crescimento estudados entre os grupos TLT e TTT, nos diferentes tempos de análise. Na presente tese, não avaliamos a regeneração entre os grupos estudados através de análises histomorfométricas, além do que, nosso tempo experimental mais extenso (8 dias) é muito breve para avaliar o desfecho do processo de regeneração em relação à densidade axonal ou recuperação funcional. Número considerável de trabalhos que utilizaram fatores de crescimento associados à condutos tubulares diversos, com foco na regeneração de nervo, acompanharam suas análises em tempos de estudo que variaram de várias semanas à meses (SARKER et al., 2018). Não podemos inferir então se haveria maior sucesso regenerativo em uma das técnicas ou em ambas. Estudos posteriores a longo prazo são necessários para evidenciar possíveis diferenças entre as técnicas látero-terminal e término-terminal. A realização de novos tempos experimentais intercalados entre os tempos de análise aqui realizados (24h, 96h e 8 dias), assim como a inserção de novos grupos com enfoque em um acompanhamento mais extenso dos mecanismos de ação referente aos eventos moleculares da regeneração (semanas e meses), constituem-se em alternativas a serem aplicadas em estudos futuros.

5.5. Análise estatística dos conjuntos

Análise estatística quantitativa pôde ser aplicada somente para comparar a expressão média dos conjuntos de elementos das três categorias estudadas (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) num comparativo entre os grupos normal *versus* experimentais (GN *versus* TLT padrão, GN *versus* TTT padrão P e GN *versus* TTT padrão D) e entre experimentais (TLT padrão *versus* TTT padrão P e TLT padrão *versus* TTT padrão D), devido ao número final de réplicas experimentais diminuto (n=2).

No comparativo entre conjuntos, identificamos que o grupo normal apresentou expressão significativamente maior em comparação aos grupos experimentais nos tempos de 24h e/ou 8 dias, em todas as categorias investigadas. No comparativo dos conjuntos entre os grupos experimentais, TLT padrão, TTT padrão P e TTT padrão D, nossos achados mostram que, numa visão geral, o grupo TLT apresentou expressão significativamente superior aos TTTs. Esses dados, mesmo avaliados num conjunto total de elementos, reforçam nossos resultados individuais discutidos anteriormente a respeito da necessidade de que, na técnica látero-terminal, ocorra um evento celular e molecular forte o bastante para romper as barreiras conjuntivas intactas do nervo doador, permitindo que haja a profusão do brotamento axonal colateral com intuito de reinervar o órgão alvo lesionado. Estudos posteriores com maior número de réplicas amostrais possibilitará a comparação com vistas à análise estatística individual entre elementos, análise que não foi possível aplicar na presente tese.

Ao longo dos processos degenerativo e regenerativo, a gama de moléculas liberadas (citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos) vão interferir diretamente no sucesso ou insucesso da regeneração axonal (ECHEVERRY et al., 2011). Na presente tese, a partir da comparação de elementos moleculares entre as duas técnicas, látero-terminal e término-terminal, podemos sugerir, que molecularmente, ambas apresentam padrões sequenciais diferentes, além de inferir que a escolha da técnica é uma determinante quanto a gama de moléculas sinalizadoras que serão expressas no tecido lesionado, podendo essas influenciar positivamente ou negativamente no processo regenerativo. A escassez de estudos utilizando metodologias semelhantes às empregadas no presente estudo, visando a identificação de perfis moleculares, dificulta a comparação dos nossos resultados.

A presença de moléculas sinalizadoras no local da lesão, citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos, representa um produto de uma série de populações celulares, inclusive endoteliais e epiteliais, que são produzidas, geralmente, no sítio inflamatório. Todas as proteínas estudadas na presente investigação são sintetizadas e expressas por uma numerosa gama de tipos celulares diversos. Estudos futuros são também requeridos com intuito de identificar o perfil celular presente entre as duas técnicas microcirúrgicas de reparo de nervo abordadas neste, a TLT e a TTT, permitindo complementar nossos achados a respeito das moléculas presentes com dados adicionais da presença e ação celular.

No âmbito clínico, a compreensão das vias moleculares e celulares que envolvem os mecanismos de ação nos processos degenerativo e regenerativo, aumenta a possibilidade do surgimento de novas terapias voltadas para a otimização da regeneração de nervos.

6. CONCLUSÕES

Há diferença quanto ao perfil molecular sequencial da resposta imune após lesão de nervo entre as técnicas tubulização látero-terminal (TLT) e tubulização término-terminal (TTT), sendo que há número maior de mediadores moleculares expressos na TLT em comparação à TTT.

O tempo experimental de expressão mais evidente dos mediadores moleculares estudados, tanto na quantidade de elementos quanto na intensidade de expressão, ocorreu em 96 horas, em ambos os grupos, TLT e TTT.

7. REFERÊNCIAS

ABBADIE C, BHANGOO S, DE KONINCK Y, MALCANGIO M, MELIK-PARSADANIAN TZ S, WHITE FA. Chemokines and pain mechanisms. **Brain Research Reviews**, 60(1):125-34, 2009.

ABDIPRANOTO-COWLEY A, PARK JS, CROUCHER D, DANIEL J, HENSHALL S, GALBRAITH S, MERVIN K, VISSEL B. Activin A is essential for neurogenesis following neurodegeneration. **Stem Cells**, 27(6):1330-46, 2009.

AHMED MR, BASHA SH, GOPINATH D, MUTHUSAMY R, JAYAKUMAR R. Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 10(1):17-30, 2005.

AIJIE C, XUAN L, HUIMIN L, YANLI Z, YIYUAN K, YUQING L, LONGQUAN S. Nanoscaffolds in promoting regeneration of the peripheral nervous system. **Nanomedicine (Lond)**, 13(9):1067-1085, 2018.

AKEDA K, HIRATA H, MATSUMOTO M, FUKUDA A, TSUJII M, NAGAKURA T, OGAWA S, YOSHIDA T, UCHIDA A. Regenerating axons emerge far proximal to the coaptation site in end-to-side nerve coaptation without a perineurial window using a T-shaped chamber. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 117(4):1194-203, 2006.

ALOVSKAYA A, ALEKSEEVA T, PHILLIPS JB, KING V, BROWN R. Fibronectin, Collagen, Fibrin – Components of Extracellular Matrix for Nerve Regeneration. In: Ashammakhi, N.; Reis, R. L. and Chiellini, E. eds. **Topics in Tissue Engineering**, vol. 3, 2007.

AL-QATTAN MM, AL-THYNAN A. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. **British Journal of Plastic Surgery**, 51:238-242, 1998.

ALZOGHAIBI MA, ZUBAIDI AM. Upregulation of the proinflammatory cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in rats' intestinal anastomotic wound healing--does it matter? **Asian Journal of Surgery**, 37(2):86-92, 2014.

ANSSELIN AD, FINK T, DAVEY DF. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, 23(5):387-98, 1997.

ARMADA-DA-SILVA PAS, PEREIRA C, AMADO S, LUIS A, MAURICIO AC. Activity-based strategies in the rehabilitation of peripheral nerve injuries. **Peripheral Neuropathy**, Maio 28, 2014.

ARSLANTUNALI D, DURSUN T, YUCEL D, HASIRCI N, HASIRCI V. Peripheral nerve conduits: technology update. **Medical devices (Auckland, N.Z.)**, 7:405-24, 2014.

AUSTIN PJ, MOALEM-TAYLOR G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **Journal of Neuroimmunology**, 15;229(1-2):26-50, 2010.

BAILEY SB, EICHLER ME, VILLADIEGO A, RICH KM. The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. **Journal of Neurocytology**, 32:176-84, 1993.

BALLANCE CA, BALLANCE HA, STEWART P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. **British medical journal**, 2(1):1009-13, 1903.

BARIK A, ZHANG B, SOHAL GS, XIONG WC, MEI L. Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction. **Developmental Neurobiology**, 74(8):828-38, 2014.

BARRETTE B, CALVO E, VALLIÈRES N, LACROIX S. Transcriptional profiling of the injured sciatic nerve of mice carrying the Wld(S) mutant gene: identification of genes involved in neuroprotection, neuroinflammation, and nerve regeneration. **Brain, Behavior, and Immunity**, 24(8):1254-67, 2010.

BASU A, KRADY JK, LEVISON SW. Interleukin-1: A Master Regulator of Neuroinflammation. **Journal of Neuroscience Research**, 78:151–156, 2004.

BATTISTON B, GEUNA S, FERRERO M, TOS P. Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. **Microsurgery**, 25 (4):258-67, 2005.

BE'ERI H, REICHERT F, SAADA A, ROTSHENKER S. The cytokine network of wallerian degeneration: IL-10 and GM-CSF. **European Journal of Neuroscience**, 10:2707–2713, 1998.

BELKAS JS, SHOICHET MS, MIDHA R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. **Neurological Research**, 26(2):151-60, 2004.

BENOIT M, DESNUES B, MEGE J-L. Macrophage polarization in bacterial infections. **Journal of Immunology**, 181(6):3733–9, 2008.

BENOWITZ LI, POPOVICH PG. Inflammation and axon regeneration. **Current Opinion in Neurology**, 24(6):577-83, 2011.

BIRKEDAL-HANSEN H, MOORE WG, BODDEN MK, WINDSOR LJ, BIRKEDAL HANSEN B, DECARLO A, ENGLER JA. Matrix metalloproteinases: a review. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, 4:197–250, 1993.

BLASING H, HENDRIX S, PAUS R. Pro-inflammatory cytokines upregulate the skin immunoreactivity for NGF, NT-3, NT-4 and their receptor, p75NTR in vivo: a preliminary report. **Archives of Dermatological Research**, 296:580–584, 2005.

BLOCH J, FINE EG, BOUCHE N, ZURN AD, AEBISCHER P. Nerve growth factor- and neurotrophin-3-releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. **Experimental Neurology**, 172:425–432, 2001.

BOATO F, HECHLER D, ROSENBERGER K, LÜDECKE D, PETERS EM, NITSCH R, HENDRIX S. **Journal of Neuroinflammation**, 8:183, 2011.

BODE W, FERNANDEZ-CATALAN C, GRAMS F, GOMES-RÜTH FX, NAGASE H, TSCHESCHE H, MASKOS K. Insights into MMP-TIMP interactions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 878: 73–91, 1999.

BOIVIN A, PINEAU I, BARRETTE B, FILALI M, VALLIERES N, RIVEST S, LACROIX S. Toll-like receptor signaling is critical for Wallerian degeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroscience**, 27:12565–12576, 2007.

BOSSE F. Extrinsic cellular and molecular mediators of peripheral axonal regeneration. **Cell and Tissue Research**, 349(1):5-14, 2012.

BOYD JG, GORDON T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. **Molecular Neurobiology**, 27:277-324, 2003.

BREW K, DEENDAYAL D, NAGASE H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1477:267–283. 2000.

BRUSHART TM. **Nerve repair**. Oxford University Press. New York. Oxford, 2011.

BURNETT MG, ZAGER EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical Focus**, 15;16(5):E1, 2004.

CÁMARA-LEMARROY CR, GUZMÁN-DE LA GARZA FJ, FERNÁNDEZ-GARZA NE. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. **Neuroimmunomodulation**, 17(5):314-24, 2010.

CAO ZX, GAO Y, BRYSON JB, HOU JW, CHAUDHRY N, SIDDIQ M, MARTINEZ J, SPENCER T, CARMEL J, HART RB, FILBIN MT. The cytokine interleukin-6 is sufficient but not necessary to mimic the peripheral conditioning lesion effect on axonal growth. **Journal of Neuroscience**, 26:5565–5573, 2006.

CAWSTON TE, YOUNG DA. Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. **Cell and Tissue Research**, 339: 221–235, 2010.

CHAN JR, COSGAYA JM, WU YJ, SHOOTER EM. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98:14661–14668, 2001.

CHEN CJ, OU YC, LIAO SL, CHEN WY, CHEN SY, WU CW, WANG CC, WANG WY, HUANG YS, HSU SH. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. **Experimental Neurology**, 204(1):443-53, 2007.

CHEN P, PIAO X, BONALDO P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. **Acta Neuropathologica**, 130(5):605–18, 2015.

CHEN YS, HSIEH CL, TSAI CC, CHEN TH, CHENG WC, HU CL, YAO CH. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. **Biomaterials**, 21(15):1541-7, 2000.

CHEN ZL, YU WM, STRICKLAND S. Peripheral regeneration. **Annual Review of Neuroscience**, 30:209-33, 2007.

CHUI R, DOROVINI-ZIS K. Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. **Journal of Neuroinflammation**, 7:1–12, 2010.

CLEMENTS MP, BYRNE E, CAMARILLO GUERRERO LF, CATTIN AL, ZAKKA L, ASHRAF A, BURDEN JJ, KHADAYATE S, LLOYD AC, MARGUERAT S, PARRINELLO S. The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration. **Neuron**, 27;96(1):98-114, 2017.

COLEMAN M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. **Nature Reviews Neuroscience**, 6(11):889-98, 2005.

CURFS JH, MEIS JF, HOOBKAMP-KORSTANJE JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, 10(4): 742–780, 1997.

DAHLIN LB. The biology of nerve injury and repair. **Journal of the American Society for Surgery of the Hand**, 4 (3):143-52, 2004.

DAHLIN LB, LUNDBORG G. Use of tubes in peripheral nerve repair. **Neurosurgery Clinics of North America**, 12(2):341-52, 2001.

DALAMAGKAS K, TSINTOU M, SEIFALIAN A. Advances in peripheral nervous system regenerative therapeutic strategies: A biomaterials approach. **Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications**, 1;65:425-32, 2016.

DALEY WP, PETERS SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **Journal of Cell Science**, 121: 255–264, 2008.

DALY W, YAO L, ZEUGOLIS D, WINDEBANK A, PANDIT A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. **Journal of The Royal Society Interface**, 7;9(67):202-21, 2012.

DANIELSEN N, DAHLIN LB, THOMSEN P. Inflammatory cells and mediators in the silicone chamber model for nerve regeneration. **Biomaterials**, 14(15):1180-5, 1993.

DANIELSEN N, VARON S. Characterization of neurotrophic activity in the silicone-chamber model for nerve regeneration. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, 11(3):231-5, 1995.

DeFRANCESCO-LISOWITZ A, LINDBORG JA, NIEMI JP, ZIGMOND RE. The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. **Neuroscience**, 27;302:174-203, 2015.

DENT EW, GUPTON SL, GERTLER FB. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 1;3(3), 2011.

DEUMENS R, BOZKURT A, MEEK MF, MARCUS MA, JOOSTEN EA, WEIS J, BROOK GA. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. **Progress in Neurobiology**, 92(3):245-76, 2010.

DODLA MC, BELLAMKONDA RV. Differences between the effect of anisotropic and isotropic laminin and nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across long peripheral nerve gaps. **Biomaterials**, 29:33–46, 2008.

DUBOVY P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. **Annals of Anatomy**, 193(4):267-75, 2011.

DUBOVY P, JANČÁLEK R, KUBEK T. Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. **International Review of Neurobiology**, 108:173-206, 2013.

DUBOVY P, RAŠKA O, KLUSÁKOVÁ I, STEJSKAL L, CELAKOVSKÝ P, HANINEC P. Ciliary neurotrophic factor promotes motor reinnervation of the musculocutaneous nerve in an experimental model of end-to-side neurorrhaphy. **BMC Neuroscience**, 22;12:58, 2011.

ECHEVERRY S, SHI XQ, RIVEST S, ZHANG J. Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. **Journal of Neuroscience**, 27;31(30):10819-28, 2011.

FARONI A, MOBASSERI SA, KINGHAM PJ, REID AJ. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 82-83:160-7, 2015.

FAWCETT JW, KEYNES RJ. Peripheral nerve regeneration. **Annual Review of Neuroscience**, 13:43-50, 1990.

FENRICH K, GORDON T. Canadian Association of Neuroscience review: Axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems - Current issues and advances. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, 31:142–156, 2004.

FERNANDEZ-VALLE C, BUNGE RP, BUNGE MB. Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. **Journal of Neurocytology**, 24(9):667-79, 1995.

FIELDS RD, LE BEAU JM, LONGO FM, ELLISMAN MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Progress in Neurobiology**, 33:87-134, 1989.

FREGNAN F, MURATORI L, RODRIGUEZ SIMÕES A, GIACOBINI-ROBECCHI MG, RAIMONDO S. Role of inflammatory cytokines in peripheral nerve injury. **Neural Regeneration Research**, 15; 7(29): 2259–2266, 2012.

FRIEDMAN B, SCHERER SS, RUDGE JS, HELGREN M, MORRISEY D, MCCLAIN J, WANG DY, WIEGAND SJ, FURTH ME, LINDSAY RM, IP NY. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. **Neuron**, 9(2):295-305, 1992.

FROSTICK, SP, YIN Q, KEMP GJ. Schwann cells, neurotrophic factors and peripheral nerve regeneration. **Microsurgery**, 18:397-405, 1998.

FU SY, GORDON T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. **Molecular Neurobiology**, 14(1-2):67-116, 1997.

HUBNER G, WERNER S. Serum growth factors and proinflammatory cytokines are potent inducers of activin expression in cultured fibroblasts and keratinocytes. **Experimental Cell Research**, 228:106-113, 1996.

GANTUS MA, NASCIUTTI LE, CRUZ CM, PERSECHINI PM, MARTINEZ AM. Modulation of extracellular matrix components by metalloproteinases and their tissue inhibitors during degeneration and regeneration of rat sural nerve. **Brain Research**, 29;1122(1):36-46, 2006.

GAUDET AD, POPOVICH PG, RAMER MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, 8:110, 2011.

GEORGE A, BUEHL A, SOMMER C. Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineurial tumor necrosis factor-alpha protein. **Neuroscience Letters**, 372: 215–219, 2004.

GEUNA S, FORNARO M, RAIMONDO S, GIACOBINI-ROBECCHI MG. Plasticity and regeneration in the peripheral nervous system. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, 115(1-2):91–94, 2010.

GEUNA S, TOS P, RAIMONDO S, LEE JM, GAMBAROTTA G, NICOLINO S, FORNARO M, PAPALIA I, PERROTEAU I, BATTISTON B. Functional, morphological and biomolecular assessment of posttraumatic neuro-muscular recovery in the rat forelimb model. **Acta Neurochirurgica Supplement**, 100:173-7, 2007.

GOHEEN-ROBILLARD B, MYCKATYN TM, MACKINNON SE, HUNTER DA. End-to-side neurorrhaphy and lateral axonal sprouting in a long graft rat model. **Laryngoscope**, 112(5):899-905, 2002.

GOLZ G, UHLMANN L, LÜDECKE D, MARKGRAF N, NITSCH R, HENDRIX S. The cytokine/neurotrophin axis in peripheral axon outgrowth. **European Journal of Neuroscience**, 24(10):2721-30, 2006.

GOLZADEH A, MOHAMMADI R. Effect of local administration of platelet-derived growth factor B on functional recovery of peripheral nerve regeneration: A sciatic nerve transection model. **Dental Research Journal**, 13(3):225-232, 2016.

GOMEZ-SANCHEZ JA, CARTY L, IRUARRIZAGA-LEJARRETA M, PALOMO-IRIGOYEN M, VARELA-REY M, GRIFFITH M, HANTKE J, MACIAS-CAMARA N, AZKARGORTA M, AURREKOETXEA I, DE JUAN VG, JEFFERIES HB, ASPICHUETA P, ELORTZA F, ARANSAY AM, MARTÍNEZ-CHANTAR ML, BAAS F, MATO JM, MIRSKY R, WOODHOO A, JESSEN KR. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. **Journal of Cell Biology**, 6;210(1):153-68, 2015.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, 3(1):23–35, 2003.

GORDON T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. **Neurosurgical Focus**, 26(E3):1–10, 2009.

GRAVVANIS AI, KARVELAS M, LYKLOUDIS E, LAVDAS A, PAPALOIS A, PATRALEXIS C, MATSAS R, STAMATOPOULOS C, IOANNOVICH J. The use of silicone tubes in end-to-side nerve grafting. An experimental study. **European Journal of Plastic Surgery**, 26:111-115, 2003.

GRAVVANIS AI, LAVDAS A, PAPALOIS AE, FRANCESCHINI I, TSOUTSOS DA, DUBOIS-DALCQ M, MATSAS R, IOANNOVICH JD. Effect of genetically modified Schwann cells with increased motility in end-to-side nerve grafting. **Microsurgery**, 25:423-432, 2005.

GRIFFIN JW, THOMPSON WJ. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. **Glia**, 56:1518–1531, 2008.

GUERREIRO R, SANTOS-COSTA Q, AZEVEDO-PEREIRA JM. The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions. **Acta Medica Portuguesa**, 24(4):967-76, 2011.

GUERTIN AD, ZHANG DP, MAK KS, ALBERTA JA, KIM HÁ. Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. **Journal of Neuroscience**, 25:3478–3487, 2005.

HALL S. Mechanisms of repair after traumatic injury. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R. **Peripheral neuropathy**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company editors; 1403-33, 2005.

HAYASHI A, YANAI A, KOMURO Y, NISHIDA M, INOUE M, SEKI T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 114(1):129-37, 2004.

HEATH CA, RUTKOWSKI GE. The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. **Trends in Biotechnology**, 6(4):163-8, 1998.

HEUMANN R, LINDHOLM D, BANDTLOW C, et al. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 84:8735-9, 1987.

HIROTA H, KIYAMA H, KISHIMOTO T, TAGA T. Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. **The Journal of Experimental Medicine**, 183:2627– 2634, 1996.

HOBSON MI. Increased vascularisation enhances axonal regeneration within an acellular nerve conduit. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, 84(1):47-53, 2002.

HOBSON MI, GREEN CJ, TERENCE G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. **Journal of Anatomy**, 197(4):591-605, 2000.

HOLLOWELL JP, VILLADIEGO A, RICH KM. Sciatic nerve regeneration across gaps within silicone chambers: long-term effects of NGF and consideration of axonal branching. **Experimental Neurology**, 110:45-51, 1990.

HOUWELLING DA, LANKHORST AJ, GISPEN WH, BÄR PR, JOOSTEN EAJ. Collagen containing Neurotrophin-3 (NT-3) attracts regrowing injured corticospinal axons in the adult rat spinal cord and promotes partial functional recovery. **Experimental Neurology**, 153:49–59, 1998.

HUGHES PM, WELLS GM, PERRY VH, BROWN MC, MILLER KM. Comparison of matrix metalloproteinase expression during Wallerian degeneration in the central and peripheral nervous systems. **Neuroscience**, 113:273–287, 2002.

HYUNG S, IM SK, LEE BY, SHIN J, PARK JC, LEE C, SUH JF, HUR EM. Dedifferentiated Schwann cells secrete progranulin that enhances the survival and axon growth of motor neurons. **Glia**, 2018. [Epub ahead of print]

IDE C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**, 25(2):101-21, 1996.

ISHIHARA K, HIRANO T. Molecular basis of the cell specificity of cytokine action. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1592(3):281-96, 2002.

ITO Y, YAMAMOTO M, LIM, DOYU M, TANAKA F, MUTCH T, MITSUMA T, SOBUE G. Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha and gp130) in injured peripheral nerves. **Brain Research**, 18;793(1-2):321-7, 1998.

JABERI FM, ABBAS BP, NEZHAD ST, TANIDEH N. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. **Microsurgery**, 23(4):359-62, 2003.

JABLONSKI KA, AMICI SA, WEBB LM, RUIZ-ROSADO JDE D, POPOVICH PG, PARTIDA-SANCHEZ S, GUERAU-DE-ARELLANO M. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. **PLoS One**, 10(12):e0145342, 2015.

JANJIC JM, S GORANTLA V. Peripheral Nerve Nanoimaging: Monitoring Treatment and Regeneration. **Journal of American Association of Pharmaceutical Scientists**, 19(5):1304-1316, 2017.

JESSEN KR, MIRSKY R. Negative Regulation of Myelination: Relevance for development, Injury, and Demyelinating Disease. **Glia**, 56:1552-1565, 2008.

JESSEN KR, MIRSKY R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. **The Journal of Physiology**, 1;594(13):3521-31, 2016.

JOHNSON EO, SOUCACOS PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides. **Injury**, 39(3):30–36, 2008.

JOHNSTON AP, YUZWA SA, CARR MJ, MAHMUD N, STORER MA, KRAUSE MP, JONES K, PAUL S, KAPLAN DR, MILLER FD. Dedifferentiated Schwann Cell Precursors Secreting Paracrine Factors Are Required for Regeneration of the Mammalian Digit Tip. **Cell Stem Cell**, 6;19(4):433-448, 2016.

JUNG Y, NG JH, KEATING CP, SENTHIL-KUMAR P, ZHAO J, RANDOLPH MA, WINOGRAD JM, EVANS CL. Comprehensive evaluation of peripheral nerve regeneration in the acute healing phase using tissue clearing and optical microscopy in a rodent model. **PLoS One**, 9(4):e94054, 2014.

KHERIF S, DEHAUPAS M, LAFUMA C, FARDEAU M, ALAMEDDINE HS. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, 24:309–319, 1998.

KOEPPEN AH. Wallerian degeneration: history and clinical significance. **Journal of the Neurological Sciences**, 15;220(1-2):115-7, 2004.

KOLTSOVA EK, LEY K. The mysterious ways of the chemokine CXCL5. **Immunity**, 23;33(1):7-9, 2010.

KRAYCHETE DC, CALASANS MTA, VALENTE CML. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 46(3):199-206, 2006.

KRIVOLUTSKAIA EG, CHUMASOV EI, MATINA VN, MEL'TSOVA GM, KIRILLOV AL. End-to-side type of plastic repair of the facial nerve branches. **Stomatologiia (Mosk)**, 68(6):35-8, 1989.

LA FLEUR M, UNDERWOOD JL, RAPPOLEE DA, WERB Z. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. **The Journal of Experimental Medicine**, 184:2311–2326, 1996.

LABRADOR RO, BUTÍ M, NAVARRO X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. **Experimental Neurology**, 149(1):243-52, 1998.

LE BEAU JM, LACORBIERE M, POWELL HC, ELLISMAN MH, SCHUBERT D. Extracellular fluid conditioned during peripheral nerve regeneration stimulates Schwann cell adhesion, migration and proliferation. **Brain Research**, 30;459(1):93-104, 1988.

LEE AC, YU VM, LOWE JB, BRENNER MJ, HUNTER DA, MACKINNON SE, et al. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. **Experimental Neurology**, 184(1):295-303, 2003.

LEE BK, JU YM, CHO JG, JACKSON JD, LEE SJ, ATALA A AND YOO JJ. End-to-side neurorrhaphy using an electrospun PCL/collagen nerve conduit for complex peripheral motor nerve regeneration. **Biomaterials**, 33:9027-36, 2012.

LEE HK, SHIN YK, JUNG J, SEO SY, BAEK SY, PARK HT. Proteasome inhibition suppresses Schwann cell dedifferentiation in vitro and in vivo. **Glia**, 57:1825–1834, 2009.

LENTZ SI, KNUDSON CM, KORSMEYER SJ, SNIDER WD. Neurotrophins support the development of diverse sensory axon morphologies. **Journal of Neuroscience**, 19:1038–1048, 1999.

LI GS, LI QF, DONG MM, ZAN T, DING S, LIU LB. Complement components of nerve regeneration conditioned fluid influence the microenvironment of nerve regeneration. **Neural Regeneration Research**, 11(4): 682–686, 2016.

LI S, GU X, YI S. The Regulatory Effects of Transforming Growth Factor- β on Nerve Regeneration. **Cell Transplantation**, 13;26(3):381-394, 2017.

LIN E, CALVANO SE, LOWRY SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, 127:117-126, 2000.

LIN MY, MANZANO G, GUPTA R. Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair. **Hand Clinics**, 29(3):331–348, 2013.

LONGO FM, MANTHORPE M, SKAPER SD, LUNDBORG G, VARON S. Neuronotrophic activities accumulate in vivo within silicone nerve regeneration chambers. **Brain Research**, 261(1):109-16, 1983a.

LONGO, F. M., SKAPER, S. D., MANTHORPE, M., WILLIAMS, L. R., LUNDBORG, G. and VARON, S. Temporal changes in neuronotrophic activities accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. **Experimental Neurology**, 81,756-769, 1983b.

LU P, TAKAI K, WEAVER VM, WERB Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 3(12), 2011.

LUNDBORG G, DAHLIN LB, DANIELSEN N, GELBERMAN RH, LONGO FM, POWELL HC, VARON S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap lenght and of distal stump components. **Experimental Neurology**, 76(2):361-75, 1982a.

LUNDBORG G, GELBERMAN RH, LONGO FM, POWELL HC, VARON S. In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 41(4):412-22, 1982b.

LUNDBORG G, HANSSON HA. Nerve regeneration through preformed pseudosynovial tubes. A preliminary report of a new experimental model for studying the regeneration and reorganization capacity of peripheral nerve tissue. **The Journal of Hand Surgery**, 5:1, 35-8, 1980.

LUNDBORG G, HANSSON HA. Regeneration of peripheral nerve through a preformed tissue space. Preliminary observations on the reorganization of regenerating nerve fibres and perineurium. **Brain Research**, 178(2-3):573-6, 1979.

LUNDBORG G, LONGO FM, VARON S. Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. **Brain Research**, 232(1):157-61, 1982.

LUNDBORG G, ZHAO Q, KANJE M, DANIELSEN N, KERNS JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? **The Journal of Hand Surgery: British & European Volume**, 19(3):277-82, 1994.

LYKISSAS MG, KOROMPILIAS AV, BATISTATOU AK, MITSIONIS GI, BERIS AE. Can end-to-side neurorrhaphy bridge large defects? An experimental study in rats. **Muscle & Nerve**, 36(5):664-71, 2007.

MADISON R, DA-SILVA CF, DIKKES P, CHIU TH, SIDMAN RL. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. **Experimental Neurology**, 88(3):767-72, 1985.

MANASSERI B, RAIMONDO S, GEUNA S, G RISITANO, STAGNO D'ALCONTRES F. Ulnar nerve repair by end-to-side neurorrhaphy on the median nerve with interposition of vein: an experimental study. **Microsurgery**, 27(1):27-31, 2007.

MANTOVANI A. Chemokines. Introduction and overview. **Chemical Immunology**, 72:1-6, 1999.

MANTOVANI A, SICA A, LOCATI M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, 23(4):344–6, 2005.

MARTINI R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. **Journal of Neurocytology**, 23:1–28, 1994.

MATSUDA M, HUH Y, JI RR. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **Journal of Anesthesia**, 2018. [Epub ahead of print]

MATSUMOTO M, HIRATA H, NISHIYAMA M, MORITA A, SASAKI H, UCHIDA A. Schwann cells can induce collateral sprouting from intact axons: experimental study of end-to-side neuroorrhaphy using a Y-chamber model. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, 15:281-286, 1999.

MCCAULEY LJ, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Current Opinion in Cell Biology**, 13:534-540, 2001.

MEYER M, MATSUOKA I, WETMORE C, et al. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. **The Journal of Cell Biology**, 119:45-54, 1992.

MIMURA T, DEZAWA M, KANNO H, SAWADA H, YAMAMOTO I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. **Journal of Neurosurgery**, 101(5):806-12, 2004.

MIRSKI R, REICHERT F, KLAR A, ROTSHENKER S. Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) activity is regulated by a GM-CSF binding molecule in Wallerian degeneration following injury to peripheral nerve axons. **Journal of Neuroimmunology**, 140:88–96, 2003.

MUELLER M, LEONHARD C, WACKER K, RINGELSTEIN EB, OKABE M, HICKEY WF, KIEFER R. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. **Laboratory Investigation**, 83(2):175-85, 2003.

MURAKAMI T, FUJIMOTO Y, YASUNAGA Y, ISHIDA O, TANAKA N, IKUTA Y, OCHI M. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. **Brain Research**, 974(1-2):17-24, 2003.

NASCIMENTO-ELIAS, AH. **Veículos, indutores e tubulização látero-terminal na regeneração do nervo periférico**. 2013. 127 f. Tese (Doutorado em Neurologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

NAVARRO X, RODRÍGUEZ FJ, CEBALLOS D, VERDÚ E. Engineering an artificial nerve graft for the repair of severe nerve injuries. **Medical & Biological Engineering & Computing**, 41(2):220-6, 2003.

NOAH EM, WILLIAMS A, FORTES W, TERZIS JK. A new animal model to investigate axonal sprouting after end-to-side neurorrhaphy. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, 13(5):317-25, 1997.

OLIVEIRA CMB, SAKATA RK, ISSY AM, GEROLA LR, Salomão R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 61: 2: 255-265, 2011.

OUDEGA M, HAGG T. Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord. **Experimental Neurology**, 140:218-229, 1996.

PEREIRA-LOPES FR, CAMARGO DE MOURA CAMPOS L, DIAS CORRÊA J JR, BALDUINO A, LORA S, LANGONE F, BOROJEVIC R, BLANCO MARTINEZ AM. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. **Experimental Neurology**, 198(2):457-68, 2006.

PEREIRA-LOPES FR, FRATTINI F, MARQUES SA, ALMEIDA FM, CAMPOS LCM, LANGONE F, LORA S, BOROJEVIC R, MARTINEZ AMB. Transplantation of bone-marrow-derived cells into a nerve guide resulted in transdifferentiation into Schwann cells and effective regeneration of transected mouse sciatic nerve. **Micron**, 41:783-790, 2010.

PERRIN FE, LACROIX S, AVILES-TRIGUEROS M, DAVID S. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 alpha and interleukin-1 beta in Wallerian degeneration. **Brain**, 128:854-866, 2005.

PFISTER LA, PAPALOIZOS M, MERKLE HP, GANDER B. Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 12(2):65-82, 2007.

PIROTTÉ N, LEYNEN N, ARTOIS T, SMEETS K. Do you have the nerves to regenerate? The importance of neural signalling in the regeneration process. **Developmental Biology**, 1;409(1):4-15, 2016.

PROUDFOOT AE, POWER CA, ROMMEL C, WELLS TN. Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. **Seminars in Immunology**, 15(1):57-65, 2003.

RAEBURN CD, SHEPPARD F, BARSNESS KA, ARYA J, HARKEN AH. Cytokines for surgeons. **The American Journal of Surgery**, 183(3):268-73, 2002.

RICCIO M, MARCHESINI A, PUGLIESE P, DE FRANCESCO F. Nerve repair and regeneration: Biological tubulization limits and future perspectives. **Journal of Cellular Physiology**, 2018.

RICHARDSON PM, LU X. Inflammation and axonal regeneration. **Journal of Neurology**, 242(1):57-60, 1994.

ROITT IM, BROSTOFF J, MALE DK. **Immunology**, 8th Edition, Saunders, 2013.

ROLLINS BJ. Chemokines. **Blood**, 90(3):909-28, 1997.

ROTSHENKER S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, 30;8:109, 2011.

ROVAK JM, CEDERNA PS, KUZON WM. Terminolateral Neuroorrhaphy: A Review of the Literature. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, 17(8):615-24, 2001.

SAADA A, REICHERT F, ROTSCHENKER S. Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. **The Journal of Cell Biology**, 133(1):159-67, 1996.

SAITOH F, ARAKI T. Proteasomal degradation of glutamine synthetase regulates Schwann cell differentiation. **Journal of Neuroscience**, 30:1204–1212, 2010.

SARKAR D, ZHAO W, SCHAEFER S, ANKRUM JA, TEO GSL, PEREIRA MN, FERREIRA L, KARP JM. Overview of tissue engineering concepts and applications. **Biomaterials Science**, 1122–1137, 2013.

SARKER MD, NAGHIEH S, MCINNES AD, SCHREYER DJ, CHEN X. Regeneration of peripheral nerves by nerve guidance conduits: Influence of design, biopolymers, cells, growth factors, and physical stimuli. **Progress in Neurobiology**, 2018.

SATOU T, NISHIDA S, HIRUMA S, TANJI K, TAKAHASHI M, FUJITA S, MIZUHARA Y, AKAI F, HASHIMOTO S. A morphological study on the effects of collagen gel matrix on regeneration of severed rat sciatic nerve in silicone tubes. **Acta Pathologica Japonica**, 36:199-208, 1986.

SAXENA S, CARONI P. Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. **Progress in Neurobiology**, 83(3):174-91, 2007.

SCHEIB J, HÖKE A. Advances in peripheral nerve regeneration. **Nature Reviews Neurology**, 9(12):668-76, 2013.

SCHMIDT CE, LEACH JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. **Annual Review of Biomedical Engineering**, 5:293-347, 2003.

SEBBEN AD, COCOLICHIO F, SCHMITT APV, CURRA MD, VIEGAS DA SILVA P, TRES GL, BRAGA SILVA J. Effect of neurotrophic factors on peripheral nerve repair. **Scientia Medica (Porto Alegre)**, 21(2):81-89, 2011.

SEBBEN AD, LICHTENFELS M, BRAGA DA SILVA JL. Peripheral nerve regeneration: cell therapy and neurotrophic factors. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 46(6):643-49, 2011.

SECKEL BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. **Muscle Nerve**, 13: 785–800, 1990.

SECKEL BR, Ryan SE, Gagne RG, Chiu TH, Watkins E Jr. Target-specific nerve regeneration through a nerve guide in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 78:793–800, 1986.

SEDDON HJ. **Surgical disorders of the peripheral nerves**, 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975.

SEDDON HJ. Three types of nerve injury. **Brain**, 66:237–288, 1943.

SENDTNER M, STÖCKLI KA, THOENEN H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. **The Journal of Cell Biology**, 118(1):139-48, 1992.

SHAH P, KEPPLER L, RUTKOWSKI J. A review of platelet derived growth factor playing pivotal role in bone regeneration. **Journal of Oral Implantology**, 40(3):330-40, 2014.

SHAMASH S, REICHERT F, ROTSHENKER S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . **Journal of Neuroscience**, 15;22(8):3052-60, 2002.

SHIMOKADO KE, RAINES W, MADTES DK, BARRETT TB, BENDITT EP, ROSS R. A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. **Cell**, 43:277–286, 1985.

SHUBAYEV VI, MYERS RR. Upregulation and interaction of TNF α and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. **Brain Research**, 855:83–89, 2000.

SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Journal of Clinical Investigation**, 122(3):787–95, 2012.

SICA A, SCHIOPPA T, MANTOVANI A, ALLAVENA P. Tumour associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. **European Journal of Cancer**, 42:717–727, 2006.

SIDDIQUI TA, LIVELY S, SCHLICHTER LC. Complex molecular and functional outcomes of single versus sequential cytokine stimulation of rat microglia. **Journal of Neuroinflammation**, 13:66, 2016.

SIEBERT H, DIPPEL N, MADER M, WEBER F, BRUCK W. Matrix metalloproteinase expression and inhibition after sciatic nerve axotomy. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, 60:85–93, 2001.

SIEBERT H, SACHSE A, KUZIEL WA, MAEDA N, BRUCK W. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. **Journal of Neuroimmunology**, 110:177–185, 2000.

SIEMIONOW M, BRZEZICKI G. Chapter 8 - Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. **International Review of Neurobiology**, 141–72, 2009.

SIVOLELLA S, BRUNELLO G, FERRARESE N, DELLA PUPPA A, D'AVELLA D, BRESSAN E, ZAVAN B. Nanostructured guidance for peripheral nerve injuries: a review with a perspective in the oral and maxillofacial area. **International Journal of Molecular Sciences**, 15(2):3088–3117, 2014.

SOMMER C, WHITE F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. **Pharmacology of Pain**. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 279-302, 2010.

SONDELL M, LUNDBORG G, KANJE M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. **Journal of Neuroscience**, 19(14):5731-40, 1999.

STENSAAS L, BLOCH LM, GARCIA R, SOTELO J. Snug tubular enclosures reduce extrafascicular axonal escape at peripheral nerve repair sites. **Experimental Neurology**, 103(2):135-145, 1989.

STERNE GD, BROWN RA, GREEN CJ, TERENCE G. Neurotrophin - 3 delivered locally via fibronectin mats enhances peripheral nerve regeneration. **European Journal of Neuroscience**, 9:1388-1396, 1997.

STOLL G, GRIFFIN JW, LI CY, TRAPP BD. Wallerian degeneration in the peripheral nervous-system - participation of both Schwann-cells and macrophages in myelin degradation. **Journal of Neurocytology**, 18:671–683, 1989.

STOLL G, HARTUNG HP. The role of macrophages in degeneration and immune-mediated demyelination of the peripheral nervous system. **Advances in Neuroimmunology**, 2:163–179, 1992.

STOLL G, JANDER S, MYERS RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 7:13–27, 2002.

STOLL G, MÜLLER HW. Nerveinjury, axonal degenerationand neural regeneration: basic insights. **Brain Pathology**, 9(2):313-25, 1999.

SUBANG MC, RICHARDSON PM. Influence of injury and cytokines on synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA in peripheral nervous tissue. **European Journal of Neuroscience**, 13:521–528, 2001.

SUN W, SUN C, LIN H, ZHAO H, WANG J, MA H, CHEN B, XIAO Z, DAI J. The effect of collagen-binding NGF-beta on the promotion of sciatic nerve regeneration in a rat sciatic nerve crush injury model. **Biomaterials**, 30(27):4649-56, 2009.

SUNDERLAND S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of fuction. **Brain**, 74:491-516, 1951.

SYKOVÁ E, JENDELOVÁ P, URDZÍKOVÁ L, LESNÝ P, HEJČL A. Bone Marrow Stem Cells and Polymer Hydrogels—Two Strategies for Spinal Cord Injury Repair. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 26(7-8):1113-29, 2006.

TANAKA EM. The molecular and cellular choreography of appendage regeneration. **Cell**, 165:1598-1608, 2016.

TANG J, HUA Y, SU J, et al. Expression of VEGF and neural repair after alprostadil treatment in a rat model of sciatic nerve crush injury. **Neurology India**, 57:387-94, 2009.

TANIUCHI M, CLARK HB, SCHWEITZER JB, JOHNSON EM Jr. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. **Journal of Neuroscience**, 8(2):664-81, 1988.

TARAS JS, NANAVATI V, STEELMAN P. Nerve conduits. **Journal of Hand Therapy**, 18:191-7, 2005.

TASKINEN HS, OLSSON T, BUCHT A, KHADEMI M, SVELANDER L, ROYTТА M. Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN-gamma, IL-10 and TNFalpha mRNA. **Journal of Neuroimmunology**, 102: 17–25, 2000.

TASKINEN HS, ROYTТА M. Increased expression of chemokines (MCP-1, MIP-1alpha, RANTES) after peripheral nerve transection. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 5(2):75-81, 2000.

TASKINEN HS, ROYTТА M. The dynamics of macrophage recruitment after nerve transection. **Acta Neuropathologica**, 93(3):252–9, 1997.

TENG YD, LAVIK EB, QU X, PARK KI, OUREDNIK J, ZURAKOWSKI D, LANGER R, SNYDER EY. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99:3024–3029, 2002.

TERENGHI G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **Journal of Anatomy**, 194(1):1-14, 1999.

THAM SK, MORRISON WA. Motor collateral sprouting through an end-to-side nerve repair. **The Journal of Hand Surgery**, 23(5):844-51, 1998.

THANOS PK, OKAJIMA S, TERZIS JK. Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, 14(6.):423-36, 1998.

TIAN L, PRABHAKARAN MP, RAMAKRISHNA S. Strategies for regeneration of components of nervous system: scaffolds, cells and biomolecules. **Regenerative Biomaterials**, 2(1):31–45, 2015.

TING J, HUO G, MARIN V, ROGERS L, GORLICK N, ASCHERMAN J, CHIU DTW. End-to-side neurorrhaphy using autogenous vein nerve conduits. **Plastic Surgery**, 49:637–638, 1998.

TONA A, PERIDES G, RAHEMTULLA F, DAHL D. Extracellular-matrix in regenerating rat sciatic-nerve – a comparative-study on the localization of laminin, hyaluronic-acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 41:593–599, 1993.

TONGE DA, GOLDING JP, EDBLADH M, KROON M, EKSTROM PE, EDSTROM A. Effects of extracellular matrix components on axonal outgrowth from peripheral nerves of adult animals in vitro. **Experimental Neurology**, 146, 81–90, 1997.

TOS P, BATTISTON B, GEUNA S, GIACOBINI-ROBECCHI MG, HILL MA, LANZETTA M, OWEN ER. Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. **Microsurgery**, 20(2):65-71, 2000.

TOS P, BATTISTON B, NICOLINO S, RAIMONDO S, FORNARO M, LEE JM, CHIRILA L, GEUNA S, PERROTEAU I. Comparison of fresh and predegenerated muscle-vein-combined guides for the repair of rat median nerve. **Microsurgery**, 27(1): 48-55, 2007.

TOS P, CALCAGNI M, GIGO-BENATO D, BOUX E, GEUNA S, BATTISTON B. Use of muscle-vein-combined Y-chambers for repair of multiple nerve lesions: experimental results. **Microsurgery**, 24(6):459-64, 2004.

TOUMA E, KATO S, FUKUI K, KOIKE T. Calpain-mediated cleavage of collapsin response mediator protein (CRMP)-2 during neurite degeneration in mice. **European Journal of Neuroscience**, 26:3368–3381, 2007.

ULKUR E, YUKSEL F, ACIKEL C, OKAR I, CELIKOZ B. Comparison of functional results of nerve graft, vein graft, and vein filled with muscle graft in end-to-side neurorrhaphy. **Microsurgery**, 23:40-48, 2003.

VERDÚ E, CEBALLOS D, VILCHES JJ, NAVARRO X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 5:191-208, 2000.

VITERBO F, AMR AH, STIPP EJ, REIS FJ. End-to-side neurorrhaphy: past, present, and future. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 124(6):351-8, 2009.

VITERBO F, BROCK RS, MACIEL F, AYESTARAY B, GARBINO JA, RODRIGUES CP. End-to-side versus end-to-end neurorrhaphy at the peroneal nerve in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, 32(9):697-705, 2017.

VITERBO F, TRINDADE JC, HOSHINO K, MAZZONI NETO A. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineural sheath. Experimental study in rats. **Revista paulista de medicina**, 110(6):267-75, 1992. Erratum in: *Revista paulista de medicina*, 111(6):479, 1992.

VOGELEZANG MG, SCHERER SS, FAWCETT JW. Regulation of fibronectin alternative splicing during peripheral nerve repair. **Journal of Neuroscience Research**, 56, 323–333, 1999.

WALLER A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations on the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. **Philosophical Transactions of the Royal Society Lond**, 140:423 – 9, 1850.

WANG JT, MEDRESS ZA, BARRES BA. Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. **The Journal of Cell Biology**, 9;196(1):7-18, 2012.

WANKELL M, WERNER S, ALZHEIMER C, WERNER S. The Roles of Activin in Cytoprotection and Tissue Repair. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 995(1): 48–58, 2003.

WEBBER C, ZOCHODNE D. The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. **Experimental Neurology**, 223(1):51-9, 2010.

WEISS P, TAYLOR AC. Further experimental evidence against “Neurotropism” in nerve regeneration. **Journal of Experimental Zoology**, 95:233-257, 1944.

WEISS P, TAYLOR AC. Histomechanical analysis of nerve reunion in the rat after tubular splicing. **The Archives of Surgery**, 47:419-447, 1943.

WERLE MJ. Cell-to-cell signaling at the neuromuscular junction: the dynamic role of the extracellular matrix. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1132:13–18, 2008.

WHITTAKER M, FLOYD CD, BROWN P, GEARING AJ. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. **Chemical Reviews**, 99:2735–2776, 1999.

WHITWORTH IH, TERENCE G, GREEN CJ, BROWN RA, STEVENS E, TOMLINSON DR. Targeted delivery of nerve growth factor via fibronectin conduits assists nerve regeneration in control and diabetic rats. **European Journal of Neuroscience**, 7:2220-2225, 1995.

WILLIAMS LR, LONGO FM, POWELL HC, LUNDBORG G, VARON S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. **Journal of Comparative Neurology**, 20; 218(4):460-70, 1983.

WILLIAMS LR, VARON S. Modification of fibrin matrix formations in situ enhances nerve regeneration in silicone chamber. **Journal of Comparative Neurology**, 231: 209-220, 1985.

WOOLLEY AL, HOLLOWELL JP, RICH KM. Fibronectin, laminin combination enhances peripheral nerve regeneration across long gaps. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, 103:509-18, 1990.

XIE XY, BARRETT JN. Membrane resealing in cultured rat septal neurons after neurite transection - evidence for enhancement by Ca²⁺-triggered protease activity and cytoskeletal disassembly. **Journal of Neuroscience**, 11:3257–3267, 1991.

YAMAUCHI T, MAEDA M, TAMAI S, TAMAI M, YAJIMA H, TAKAKURA Y, HAGA S, YAMAMOTO H. Collateral sprouting mechanism after end-to-side nerve repair in the rat. **Medical Electron Microscopy**, 33(3):151-6, 2000.

YAMAUCHI T, YAJIMA H, TAMAI S, OHGUSHI H, TAMAI M, MAEDA M, KIZAKI K, KOBATA Y, FUKUI A, TAKAKURA Y. Neurohistochemical analysis of regeneration in rat peripheral nerve after end-to-side neurorrhaphy. **Journal of Orthopaedic Science**, 6(1):82-7, 2001.

YDENS E, CAUWELS A, ASSELBERGH B, GOETHALS S, PEERAER L, LORNET G, et al. Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response. **Journal of Neuroinflammation**, 9:176, 2012.

ZACHARY I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. **Neurosignals**, 14:207-21, 2005.

ZHANG F, FISCHER KA. End-to-side neurorrhaphy. **Microsurgery**, 22:122–127, 2002.

ZHANG JM, AN J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, 45:27-37, 2007.

ZHANG Z, JOHNSON EO, VEKRIS MD, ZOUBOS AB, BO J, BERIS AE, SOUCACOS PN. Repair of the main nerve trunk of the upper limb with end-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. **Microsurgery**, 26(4):245-52, 2006.

ZHAO JZ, CHEN ZW, CHEN TY. Nerve regeneration after terminolateral neurorrhaphy: experimental study in rats. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, 13(1):31-7, 1997.

ZOCHODNE DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. **Muscle & Nerve Supplement**, 9:33-8, 2000.

ZUIJDENDORP HM, TRA WM, VAN NECK JW, MOLLIS L, COERT JH. Delay of denervation atrophy by sensory protection in an end-to-side neurorrhaphy model: a pilot study. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, 63(12):1949-52, 2010.

ANEXOS

Anexo 1.**Tabela 1.** Nomeação dos grupos por procedimentos cirúrgicos

SIGLA DESCRITIVA	MODELO EXPERIMENTAL
GN	Grupo normal
TLT padrão	Tubulização látero-terminal
TLT F-P	Tubulização látero-terminal (tubo fechado-proximal)
TLT F-D	Tubulização látero-terminal (tubo fechado-distal)
TTT padrão P TTT padrão D	Tubulização término-terminal (cotos proximal e distal)
TTT F-P	Tubulização término-terminal (tubo fechado-proximal)
TTT F-D	Tubulização término-terminal (tubo fechado-distal)

Identificação dos diferentes grupos experimentais realizados através de siglas descritivas dos mesmos.

Anexo 2.

Figura 4. Ilustração esquemática dos grupos experimentais realizados no estudo. (A, B, C) Grupo tubulização látero-terminal (TLT). (A) TLT padrão, (B) TLT com tubo de silicone fechado na extremidade distal e acoplado à lateral do nervo tibial intacto, (C) TLT com tubo de silicone fechado na extremidade proximal e acoplado ao coto distal do nervo fibular seccionado. (D, E, F) Grupo tubulização término-terminal (TTT). (D) TTT padrão, (E) TTT com tubo de silicone fechado na extremidade distal acoplado ao coto proximal do nervo fibular seccionado, (F) TTT com tubo de silicone fechado na extremidade proximal acoplado ao coto distal do nervo fibular seccionado.