**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

BRUNO CÉSAR FRESNEDAS

**Eventos seqüenciais na plasticidade do
nervo tibial anterior de ratos utilizando
tubulização-látero-terminal**

**RIBEIRÃO PRETO
2019**

BRUNO CÉSAR FRESNEDAS

Eventos seqüenciais na plasticidade do nervo tibial anterior de ratos utilizando tubulização-látero-terminal

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Neurociências

Área de concentração: Neurologia

Opção: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

Ribeirão Preto 2019

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.

Fresnedas, Bruno César

Eventos seqüenciais na plasticidade do nervo tibial anterior de ratos utilizando tubulização-látero-terminal, 2019.

p. 115: il; 30 cm

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

Orientador: Júnior, Wilson Marques .

1. Plasticidade axonal. 2. Tubulização término-terminal
3. Tubulização látero-terminal 4. Matriz Extracelular 5. Regeneração axonal

Nome: FRESNEDAS, Bruno César

Título: Eventos seqüenciais na plasticidade do nervo tibial anterior de ratos utilizando tubulização-látero-terminal

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Neurociências

Área de concentração: Neurologia

Opção: Neurociência

Aprovado em: __ / __ / ____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Márcia, que sempre me apoiou nas minhas escolhas, você é o meu farol e o meu porto seguro. Ao meu irmão Raphael.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, **Márcia Emília de Souza**, por toda uma vida de amor. Ao meu irmão **Raphael Augusto Fresnedas**, pelo seu companheirismo.

Às técnicas do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, **Maria Cristina Lopes Schiavoni**, **Giuliana França Teixeira Mandia Grossi** e a **Aracy Edwirges Vieira da Silva Dias**, por toda atenção, paciência e carinho enquanto eu aprendia. Vocês são reconhecidamente excelentes profissionais, e como pessoas são melhores ainda. Sou muito grato.

Ao especialista em laboratório **Antônio Renato Meireles e Silva**, pela sua disposição em sempre ajudar, e pelo seu auxílio para a padronização na captura e análise dos dados.

Aos estimados colegas do departamento, pela amizade, pela companhia e pelas discussões que tivemos e que foram sempre enriquecedoras; **Claudia Tarcila Gomez Matheus Rossignoli**, **Pedro Tomaselli**, **Ivan Augusto de Lorena**, **Leonardo Rakauskas Zacharias**, **Rafael Ruggiero**, **Vânia Tognon Miguel** e **Rodrigo Melo Conde**.

Aos membros do laboratório de Neurogenética, **Sílvia Andrião**, **Sandra Elizabete Marques**, **Diane** e **Thaísa**.

Ao **Prof. Dr. Wilson Marques Júnior**.

E especialmente ao **Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira**, pelo seu exemplo, pela sua atenção e pela sua vontade de ensinar, não apenas comigo, mas com todos os seus alunos, ao longo da sua vida.

*“Aprender é a única coisa de que a
mente nunca se cansa, nunca tem
medo e nunca se arrepende”*

Leonardo da Vinci

RESUMO

FRESNEDAS BC. **Eventos seqüenciais na plasticidade do nervo tibial anterior de ratos utilizando tubulização-látero-terminal**, 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução. Lesões no sistema nervoso periférico (SNP) constituem ocorrência comum. A compreensão dos processos biológicos envolvidos na sua regeneração é essencial para a evolução da prática clínica. O modelo de tubulização término-terminal (TTT) tem sido utilizado para este fim, pois permite o estudo dos eventos ocorrendo no lúmen do tubo, e a sua manipulação com a adição de fatores exógenos. **Objetivos.** Utilizamos uma variante da TTT, a tubulização látero-terminal (TLT), para analisar os eventos iniciais durante a tubulização, afetando tanto o nervo doador quanto o nervo receptor. **Métodos.** Ratas Wistar foram submetidas à secção do nervo fibular 3 mm abaixo da sua emergência do nervo isquiático. 5 mm do coto distal foram seccionados e constituíram no controle. No grupo TLT, o coto proximal foi suturado na pele, um tubo de silicone de 6 mm de comprimento foi suturado na lateral do nervo tibial e o coto distal foi suturado no tubo, criando uma lacuna de 5 mm. No grupo TTT, ambos os cotos do nervo fibular foram suturados nas extremidades do tubo de silicone, criando uma lacuna de 5 mm. A progressão da regeneração foi observada em três períodos; 24; 48 e 96 horas pós operação; utilizando as técnicas de Western Blot e imunohistoquímica para medir a expressão das proteínas: fibronectina, laminina, VEGF, S100B, GFAP e GAP43. **Resultados.** Foi observada a formação de cabo de regeneração unindo os dois cotos do nervo a partir das 48 horas, consistindo de fibronectina e laminina, com elevado número de neutrófilos, e na TTT, hemácias. Ocorreu maior aumento na expressão de proteínas associadas com lesão aguda (S100B e VEGF) e processo de regeneração axonal (GFAP e GAP43) no coto fibular proximal do que no coto tibial. A expressão da maioria das proteínas expressadas no cabo e no coto fibular distal igualaram-se após 96 horas, com exceção do VEGF, que foi mais elevado no grupo TTT, e o GAP43, mais elevado no nervo tibial da TLT 96 horas. **Conclusão.** A TLT sem janela epineural não causa dano no nervo doador, além de apresentar um perfil de expressão de proteínas no cabo de regeneração similar ao encontrado na TTT. O tempo de observação não foi o suficiente para observar diferenças entre os grupos experimentais no coto do nervo fibular distal.

Palavras Chave: 1. Plasticidade axonal 2. Tubulização término-terminal 3. Tubulização látero terminal 4. Matriz Extracelular 5. Regeneração axonal

ABSTRACT

FRESNEDAS BC. Temporal progression of the nerve plasticity in the tibial nerve of rats using end-to-side tubulization, 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introduction. Injuries in the peripheral nervous system (PNS) are a frequent occurrence. Understanding the biological events involved in the regeneration is essential for the improvement of clinical treatments. The end-to-end tubulization (ETE) has been used with this intention, because it allows the study of the events happening inside the scaffold, and its manipulation with exogenous factors. **Objectives.** We used a variation of the ETE, the side-to-end tubulization (SET) without epineural window, to analyse the initial events during the tubulization, affecting both the donor nerve and the receptor nerve, and compare it with the conventional SET. **Methods.** In the SET group the peroneal nerve of female Wistar rats were sectioned 3mm below its emergency from the sciatic nerve. The proximal stump was buried into the adjacent musculature and 3mm from the distal stump were cut. A 6 mm silicone tube was sutured in the lateral of the tibial nerve, and the distal stump sutured in the tube, creating a 5 mm gap, in the ETE group, both stumps of the peroneal nerve were sutured in the tube, creating a 5mm gap. The progression of the regeneration was observed in three periods; 24; 48 and 96 hours after the surgery. Western blot and immunohistochemistry were used measure the expression of the following proteins: fibronectin, laminin, VEGF, S100B, GFAP and GAP43. **Results.** A regeneration cable was formed between the nerve stumps after 48 hours, consisting of fibronectin and laminin. There was an increase in the expression of damage associated proteins (S100B and VEGF) and Schwann cells proliferation (GFAP) in the fibular proximal stump, when compared with the tibial nerve. At the 96 hours period, there was no difference between the expression of most proteins in the cable and in the fibular distal stump, with the exception of VEGF, higher in the ETE group, and the GAP43, higher in the tibial nerve in the SET 96 horas. **Conclusions.** The SET without epineural window does not cause damage to the donor nerve. The protein expression in the regeneration cable and the peroneal distal stump in the SET and the ETE groups was very similar after 96 hours, with the exception of the VEGF in the ETE and the GAP43 in the donor nerve after 96 hours. The observation time was not enough to see differences between the in the expression of proteins in the peroneal distal stump due to the different techniques.

Key words: 1. Axonal plasticity 2. End-to-side tubulization; 3 End-to-side 4. Extracellular Matrix 5. nerve regeneration; nerve tubulization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cirurgia dos grupos experimentais.....	39
Figura 2. Material coletado para microscopia óptica.....	41
Figura 3. Processamento digital das imagens para imunohistoquímica.....	45
Figura 4. Esquema dos grupos experimentais do Western Blot.....	49
Figura 5. Nervo tibial na TLT 24 horas.....	53
Figura 6. Nervo fibular distal do grupo TLT 24 horas.....	54
Figura 7. Coto proximal do nervo fibular TTT - 24 horas.....	55
Figura 8. Matriz de fibrina na TTT 24 horas.....	56
Figura 9. Coto fibular distal TTT 24 horas.....	57
Figura 10. Nervo tibial do grupo TLT-48 horas.....	58
Figura 11. Cabo de regeneração da TLT 48 horas.....	59
Figura 12. Nervo fibular distal na TLT 48 horas.....	60
Figura 13. Nervo fibular proximal na TTT 48 horas.....	61
Figura 14. Cabo de regeneração da TTT 48 horas.....	62
Figura 15. Nervo fibular distal na TTT 48 horas	63
Figura 16. Nervo tibial da TLT 96 horas.....	64
Figura 17. Cabo de regeneração da TLT 96 horas.....	65
Figura 18. Coto fibular proximal 96 horas.....	66
Figura 19. Cabo de regeneração do grupo TTT 96 horas.....	67
Figura 20. Coto fibular distal 96 horas.....	68
Figura 21. Densidade relativa da fibronectina por Western Blot.....	72
Figura 22. Área marcada pela IHQ da fibronectina.....	73
Figura 23. Densidade Óptica da fibronectina.....	74
Figura 24. Densidade relativa da laminina.....	75
Figura 25. Área marcada pela IHQ da laminina.....	76
Figura 26. Densidade Óptica da laminina.....	77
Figura 27. Densidade relativa do VEGF Western Blot.....	78
Figura 28. Fração da área marcada do VEGF.....	79
Figura 29. Densidade Óptica do VEGF.....	80
Figura 30. IHQ do grupo VEGF.....	81
Figura 31. Densidade relativa do S100B por Western Blot.....	82
Figura 32. Fração da área marcada do S100B.....	83

Figura 33. Densidade óptica do S100B.....	84
Figura 34. Densidade relativa do GFAP por Western Blot.....	85
Figura 35. Densidade óptica do GFAP por IHQ.....	86
Figura 36. Densidade relativa do GAP43 por Western Blot.....	87
Figura 37. Densidade Óptica do GAP 43.....	88
Figura 38. Western Blot do GAP 43.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos Experimentais.....	37
Tabela 2. Sequência de tratamentos para a inclusão em parafina.....	42
Tabela 3. Anticorpos utilizados na IHQ.....	44
Tabela 4. Anticorpos utilizados no Western Blot.....	48
Tabela 5. Densidade Relativa da fibronectina	69
Tabela 6. Fração da área da fibronectina.....	70
Tabela 7. Densidade óptica da fibronectina.....	71
Tabela 8. Densidade relativa da laminina.....	72
Tabela 9. Fração da área da laminina.....	73
Tabela 10. Densidade óptica da laminina.....	74
Tabela 11. Densidade relativa do VEGF.....	75
Tabela 12. Fração da área do VEGF.....	76
Tabela 13. Densidade óptica do VEGF.....	77
Tabela 14. Densidade relativa do S100B.....	79
Tabela 15. Fração da área do S100B.....	80
Tabela 16. Densidade óptica do S100.....	81
Tabela 17. Densidade Relativa do GFAP.....	82
Tabela 18. Densidade óptica do GFAP.....	83
Tabela 19. Densidade Relativa do GAP43.....	84
Tabela 20. Densidade óptica do GAP43.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BNDF (Brain derived neurotrophic factor)
CNTF (Ciliary neurotrophic factor)
DO (Densidade Óptica)
DR (Densidade Relativa)
FIs (Filamentos Intermediários)
HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1)
HE (Hematoxilina - Eosina)
HRE (Hypoxia response element)
GAP43 (Growth associated protein 43)
GFAP (Glial fibrillary acidic protein)
IHQ (ImunoHistoQuímica)
kDa (kilo Daltons)
MEC (Matriz extracelular)
NF (Neurofilamento)
NGF (nerve growth factor)
NLT (Neurografia látero-terminal)
RAGE (receptor for advanced glycation end products)
SNC (sistema nervoso central)
SNP (sistema nervoso periférico)
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)
TLT (Tubulização látero-terminal)
TTT (Tubulização término-terminal)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Lesões no sistema nervoso periférico.....	17
1.2 Tubulização término terminal como modelo experimental.....	18
1.3 Neurorrafia látero terminal.....	22
1.4 Tubulização látero terminal.....	23
1.5 Fibronectina.....	24
1.6 Laminina.....	26
1.7 VEGF.....	27
1.8 GFAP.....	28
1.9 GAP43.....	30
1.10 S100B.....	32
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Animais.....	37
3.2 Grupos experimentais e controle	37
3.3 Procedimento cirúrgico.....	38
3.3.1 Grupo experimental TLT.....	38
3.3.2 Grupo experimental TTT.....	39
3.3.3 Cuidados pós operatórios.....	40
3.4.1 Coleta do material para inclusão em parafina.....	41
3.4.2 Inclusão em Paraplast e cortes histológicos.....	42
3.4.3 Coloração de Hematoxilina - Eosina e Dominici.....	43
3.5 Imunohistoquímica.....	44
3.5.1 Digitalização e análise das imagens de imunohistoquímica.....	44
3.6 Western Blot.....	46
3.6.1 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	47
3.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page).....	47
3.6.4 Imunodeteção.....	49
3.7 Análise estatística.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1 Aspectos macroscópicos.....	52
4.2. Histologia descritiva - TLT 24 horas e TTT 24 horas.....	52

4.3 Histologia descritiva - TLT 48 horas e TTT 48 horas.....	58
4.4 Histologia descritiva - TLT 96 Horas e TTT 96 horas.....	64
4.5 Fibronectina.....	69
4.6 Laminina.....	72
4.7 VEGF.....	75
4.8 S100B.....	78
4.9 GFAP.....	82
4.10 GAP 43.....	84
5. DISCUSSÃO	86
5.1 Eventos sequenciais na TLT.....	87
5.2 Matriz extracelular.....	89
5.3 VEGF.....	90
5.4 Células de Schwann - S100B e GFAP.....	92
5.5 GAP43.....	95
6. CONCLUSÃO.....	98
7. REFERÊNCIAS.....	100
ANEXOS.....	113

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lesões dos nervos periféricos

Lesões no sistema nervoso periférico (SNP) são extremamente relevantes do ponto de vista clínico. A cada ano, cerca de 360.000 indivíduos nos Estados Unidos e 300.000 na Europa sofrem algum tipo de lesão no sistema nervoso periférico (BELKAS et al, 2004). A principal causa deste tipo de lesão são os acidentes de natureza mecânica, onde ocorre perfuração ou laceração do nervo causada por objetos perfuro-cortantes, onde ocorre lesão no nervo em aproximadamente 1,85% dos acidentes com trauma, ou rompimento do nervo causado por tração ou compressão, em 1,91% dos casos (TAYLOR et al, 2008). Essas lesões resultam em perda parcial ou total da atividade sensitiva e motora dos órgão afetados, eventualmente progredindo para um quadro de atrofia muscular na região distal à lesão (BORISOV, CARLSON, 2000). Ao contrário do sistema nervoso central (SNC), o SNP apresenta capacidade de regeneração espontânea, de acordo com as características e extensão da sua lesão.

O primeiro sistema de classificação de lesões no nervo periférico foi criado por Seddon (1943), onde são descritos três graus diferentes de lesão. Na neuropraxia, ocorre apenas desmielinização local, sem lesão axonal, causada por compressão do nervo. Nos casos agudos, a neuropraxia se resolve de maneira espontânea, porém em casos de compressão crônica, como na síndrome do túnel carpal, a intervenção cirúrgica pode ser necessária (DE-LAS-PEÑAS et al, 2017). A segunda classe de lesões é a axonotmeses, onde ocorre a lesão nos axônios por esmagamento, mas a continuidade do nervo, do endoneuro e do perineuro é mantida. Pode ocorrer regeneração espontânea nesse caso, mas ela geralmente é incompleta. E na neurotmeses, ocorre a transecção completa do nervo, com perda da continuidade dos axônios e do tecido conectivo do nervo, nesse caso, a regeneração apropriada não ocorre sem intervenção cirúrgica (GRINSELL, KEATING, 2014).

Em aproximadamente 87% das lesões no SNP onde ocorre neurotmeses, não há perda de tecido, ou onde ela é mínima, o que possibilita a sutura direta dos cotos (DE MEDINACELI, PRAYON, MERLE, 1993). Este é o método mais utilizado de reparo, pois proporciona a melhor regeneração (GRIFFIN et al, 2013). Porém, em casos onde

uma lacuna é formada entre os cotos, a sutura direta causa tensão no nervo, induzindo a entrada de tecido fibroso entre os cotos e prejudicando o processo de regeneração (TERZIS et al, 1975). Por esse motivo tornou-se imperativo o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas capazes de viabilizar a regeneração das fibras nervosas e superar os obstáculos causados pela perda da continuidade do nervo (EVANS, 2000). Duas técnicas de especial interesse para o reparo de nervo são a tubulização término-terminal (TTT) e a neurografia látero-terminal (NLT). Dentre as técnicas microcirúrgicas utilizadas para o tratamento de lesões no SNP encontra-se a tubulização látero-terminal (TTT), onde os cotos proximal e distal do nervo são suturados em uma estrutura tubular oca, que atua como ponte de ligação entre os dois cotos, para guiar para o crescimento axonal.

A técnica de tubulização apresentou diversos avanços desde a sua introdução na prática cirúrgica. Atualmente são utilizados tubos biodegradáveis, feitos com componentes da matriz extracelular (MEC) como fibrina (KALBERMATTEN et al, 2009), colágeno (DING et al, 2011). Eles também podem ser preenchidos com uma variedade de substâncias, com o objetivo de incentivar a regeneração, podendo ser fatores neurotróficos (ZHENG E KUFLER, 2000), proteínas que incentivem a síntese de DNA, células tronco (NIE et al, 2007), ou ainda células de Schwann (MATSUOKA, NAKANE E KURIHARA, 1997; MCGRATH et al, 2010).

1.2 Tubulização Término-Terminal como modelo experimental

A prática de intervenções cirúrgicas no SNP é relativamente recente. Historicamente, apenas depois das observações feitas por Augustus Waller (1850), sobre a capacidade de regeneração de nervos em sapos, que teve início as tentativas de reparo de nervo. O primeiro relato da técnica de TTT foi feita em 1880, quando Glück, usou um tubo feito com osso descalcificado para ligar os cotos, porém sem ter sucesso. Dois anos depois, Vanlair repetiu o experimento com sucesso, dessa vez usando um tubo feito de osso desclassificado para transpor uma lacuna de três centímetros no nervo ciático de cães. A experimentação com tubos feitos com outros materiais biológicos não tardou, e em 1891, Büngner faz os primeiros experimentos usando artérias para preencher a lacuna entre os nervos, mas por causa da dificuldade em encontrar artérias de calibre adequado, os próximos estudos focaram-se na utilização de veias, com a primeira aplicação clínica sendo reportada por Wedre em

1909. Durante as décadas seguintes, tubos e câmaras fabricados com diversos tipos de material foram testadas, entre eles tubos feitos com agar, membrana cartilaginosa, epineuro e artérias fixadas com formalina. O estudo com tubos feitos de materiais sintéticos, como metais inertes, tubos de plástico e borracha e membranas celulósicas também foi feito durante essa época, mas o primeiro uso em humanos ocorreu apenas em 1955, quando Garrity, usou tubos de borracha, polivinil e polietileno para tentar tratar, sem sucesso, três pacientes que apresentavam lacunas no nervo maiores que 7 centímetros (LITTLE et al, 2004). A maioria dessas cirurgias não obteve sucesso, e a tubulização foi abandonada em favor da sutura direta dos cotos ou da utilização de enxertos.

No início da década de 1980 foi observado o ressurgimento e a consequente evolução da técnica de TTT, devido a uma série de experimentos com tubulização do nervo isquiático de rato, com tubos feitos de material sintético, em especial silicone, como um modelo experimental. Os tubos de silicone apresentam diversas vantagens do ponto de vista experimental, pois são feitos de um material flexível, biologicamente inerte e impermeável, proporcionando um ambiente isolado ideal para o estudo da regeneração. Com base nas informações obtidas com a TTT, Fields e colaboradores (1989) fizeram a primeira descrição compreensiva das etapas da regeneração. Deve-se lembrar, que a regeneração axonal é um processo biológico complexo, com uma sequência de eventos que servem de suporte para as etapas seguintes, e tem considerável sobreposição. A formação de uma matriz de suporte precede a migração celular no interior do tubo, mas as células que penetram o tubo, também secretam proteínas da MEC e outros fatores neurotróficos que induzem o crescimento axonal.

A primeira etapa consiste na resposta pós traumática, onde inicialmente é observado rápido acúmulo de fluido seroso no interior dos tubos nas primeiras 12 horas pós implantação (LONGO et al, 1983b). Este líquido recebe o nome de fluido condicionado, e contém fatores neurotróficos capazes de induzir o crescimento de culturas de neuritos derivados do gânglio da raiz dorsal de ratos e de células neuronais de embriões de galinha (Longo et al, 1993a). Entre os fatores neurotróficos encontrados no fluido na primeira semana pós tubulização, encontram-se: as neurotrofinas 3 e 4 (NT-3; NT-4), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *nerve growth factor* (NGF) e *glial derived neurotrophic factor* (GDNF) (YE et al, 2014).

Após a fase inicial de acúmulo do fluido, é formada de uma estrutura denominada cabo de regeneração, conectando os cotos proximal e distal entre o quinto e sétimo dia pós tubulização, tanto em animais submetidos a tubulização com lacuna de 3 a 5 mm (MCDONALD et al, 2006), quanto com lacuna de 10 mm (WILLIAMS et al, 1984). Este cabo de regeneração é composto inicialmente de fibrina, uma proteínas secretada quando ocorre lesões, e tem uma composição similar a encontrada durante o processo de cicatrização em outros tecidos. Ao longo da primeira semana, a fibrina é completamente substituída por colágeno e fibronectina (LIU, 1992). Além do colágeno, outras da matriz extracelular (MEC), entre elas a fibronectina e a laminina são encontradas no cabo de regeneração, além de hemácias, fibroblastos, macrófagos e leucócitos ((LONGO et al, 1984; LE BEAU et al, 1988; LIU, 1992).

Essa matriz serve como suporte para a próxima etapa da regeneração, caracterizada pela migração células no interior do tubo, entre de fibroblastos (WILLIAMS et al, 1983), células de Schwann (FIELDS et al, 1989) e células inflamatórias, principalmente macrófagos (DAHLIN et al, 1995) e neutrófilos (DANIELSEN, DAHLIN, THORNSSEN, 1993). O crescimento de axônios não mielinizados do coto proximal ainda é limitado atingindo apenas 10% da extensão do comprimento dos tubos (WILLIAMS et al, 1984). Nesta etapa os axônios apresentam crescimento desorganizado, com alguns deles migrando em ângulos de mais de 90°, em direção oposta ao coto distal (MCDONALD et al, 2006). Um número reduzido de células de Schwann e fibroblastos, oriundas tanto do coto proximal quanto do coto distal, são encontradas no cabo de regeneração precedendo as terminações axonais, mas ainda não entraram em contato com os axônios e células de Schwann do coto proximal (WILLIAMS et al, 1984).

A fase seguinte é marcada pela formação e pelo amadurecimento de vasos sanguíneos, que podem ser observados na extremidade de ambos os cotos na segunda semana pós tubulização (JENQ, COGGESHALL, 1985). Ao longo destes vasos é observada a presença de células de Schwann. Também ocorre a proliferação e migração das células de Schwann e fibroblastos, concentrados nos primeiros 3mm dos cotos proximal e distal que, ocasionalmente se encontram no meio do cabo de regeneração, mas se tornarão prevalentes em toda a extensão do tubo na terceira semana (WILLIAMS et al, 1984). Os primeiros axônios mielinizados, originados do coto proximal, são observados na segunda semana, enquanto os axônios não mielinizados podem ser observados até a metade do cabo de regeneração (WILLIAMS

et al, 1984). A terceira e quarta semana são marcadas pelo crescimento tanto dos axônios mielinizados, quanto dos não mielinizados, ambos sendo encontrados em toda a extensão do cabo de regeneração (WILLIAMS et al, 1994). Em torno da terceira semana os axônios começam a se organizar em um fascículo no centro do cabo de regeneração, com compartimentalização dos axônios em segmentos (SCARAVILLI, 1984; UZMAN, VILLEGAS, 1983). E o epineuro é visivelmente delimitado em torno da sétima semana pós tubulização. Os meses seguintes são marcados pelo aumento do número de axônios mielinizados e do diâmetro da bainha de mielina, que atinge o diâmetro médio máximo quatro meses após a implantação do tubo, embora não retorne aos parâmetros encontrados no nervo não lesionado (FIELDS et al, 1989).

As observações feitas por estes grupos traduziram-se em aplicações na prática clínica. A adição de fatores neurotróficos, como o NGF no interior do tubo foi uma das primeiras estratégias desenvolvidas para enriquecer a regeneração (WINDEBANK, PODULSO, 1986; TANIUCHI et al, 1986; CHEN et al, 1989). A utilização de proteínas da MEC no interior dos tubos, como o colágeno, a fibronectina e a laminina também foi outra estratégia utilizada uma das primeiras estratégias utilizadas para melhorar a regeneração axonal (MADISON et al, 1985; WILLIAMS, 1985; LABRADOR, BUTÍ, NAVARRO, 1998). Os próximos grupos utilizaram métodos que permitiam a liberação controlada de fatores neurotróficos como BDNF (TERRIS et al, 2001), CNTF (ZHANG et al, 2004) e NGF (MIDHA et al, 2003), utilizando gradientes de concentração para induzir a regeneração. Estas experiências ajudaram a moldar um dos principais paradigmas da medicina regenerativa do SNP - que para uma regeneração do sistema nervoso seja bem sucedida “o ambiente regenerativo deve imitar o ambiente natural do nervo”

Apesar dos avanços obtidos com os tubos de silicone, os tubos sintéticos não absorvíveis, tem um histórico de aplicação clínica limitada, pois mesmo quando eles propiciam uma regeneração adequada, existe a possibilidade de compressão no nervo resultando em dor neuropática, e necessitando de uma cirurgia secundária para remoção do tubo (LUNDBORG, DAHLIN, DANIELSEN, 1991; DAHLIN, ANAGNOSTAKI, LUNDBORG, 2001). Atualmente diversos tipos de tubos biomiméticos, estão disponíveis comercialmente sendo utilizados com sucesso na prática clínica (DU et al, 2018).

1.3 Neurorrafia látero terminal

A neurorrafia látero-terminal (NLT) é outras das técnicas microcirúrgicas utilizadas com sucesso no reparo de nervos lesionados. Na NLT o coto distal do nervo lesionado é suturado em um nervo doador sadio, o que permitiria o crescimento de fibras originados do nervo doador e a subsequente reinervação do coto distal (VITERBO et al, 1992). Relatos de uma técnica similar, denominada anastomose cruzada, ou neurotização existem na literatura desde o final do século XIX, tanto em modelos animais (KENNEDY, 1901) quanto em pacientes com paralisia facial (BALLANCE C, BALLANCE H, STEWART, 1903) e para o tratamento da paralisia de Erb (HARRIS, LOW, 1903). Porém nestes casos foi feita lesão extensa no nervo doador, que embora tenha possibilitado uma melhora no quadro de paralisia facial, também resultou em movimentos involuntários associados com a atividade do nervo doador (STOOKEY, 1922; BABCOCK, 1927). Eventualmente a técnica foi abandonada por não proporcionar resultados comparáveis a sutura direta (MANASSE, 1922; STOOKEY, 1923; GATTA, 1938).

Viterbo e colaboradores (1992) introduziram a neurorrafia término-lateral sem a criação de janela epineural no nervo doador. A sutura direta propiciou resultados similares aos obtidos em animais com janela epineural, demonstrando pela primeira vez a possibilidade de reparo do coto distal sem a necessidade de lesionar o nervo doador sadio. Após este estudo, Lundborg e colaboradores (1994) demonstraram a capacidade da neurorrafia término-lateral de induzir o crescimento para o coto distal tanto de axônios sensitivos quanto motores. Estudos subsequentes demonstram que a NLT sem janela epineural propicia a recuperação da estrutura e função dos nervos (número de fibras, velocidade de condução e peso do músculo inervado) idêntica similar às dos animais nos quais foi realizada janela epineural (VITERBO et al, 1994a; VITERBO et al, 1994b; VITERBO et al, 1998). Entretanto outros grupos descreveram que a realização de janela epineural no sítio de coaptação do coto distal causa melhoras significativas na regeneração axonal quando comparado com animais sem janela epineural (LUNDBORG et al, 1994; ZHANG et al, 2000; XU MIDHA, MARTINEZ, 2008). Atualmente existe evidência de que a criação da janela epineural não induz necessariamente um aumento no número de fibras que atingirão o nervo receptor, apenas faz com que elas o alcancem mais rapidamente, mas estas diferenças desaparecem com tempos maiores de observação (KOVACIC et al, 2012). A técnica

de NLT tem sido utilizada na prática clínica com sucesso, especialmente para o tratamento de pacientes afetados com paralisia facial (UEDA et al, 2007).

São propostos três mecanismos para explicar a origem dos axônios que atingem o nervo receptor. Na teoria de "contaminação", os axônios regenerados tem origem no coto proximal do nervo lesionado do coto distal causado por brotamentos axonais originários do coto proximal, ainda ligado ao sistema nervoso central. A implantação do coto distal na musculatura adjacente, seria necessária para isolar estes axônios, que poderiam reinervar o músculo-alvo do nervo previamente seccionado ou desnervado (ZHANG et al, 1998; VITERBO et al, 2017).

O segundo mecanismo proposto para explicar a origem dos axônios regenerados seria o brotamento terminal das fibras, que ocorre em resposta há secção transversal das fibras nervosas, e é claramente observado na TTT. A regeneração através dos brotamentos terminais é observado quando é feito janela epi-perineural no nervo doador. Neste caso, ocorre lesão nos axônios do nervo doador, que respondem ao trauma estendendo projeções das terminações do coto proximal para reinervarem o coto distal. O mecanismo mais aceito atualmente para explicar a origem dos axônios na NLT é o dos brotamentos colaterais, originados a partir dos nodos de Ranvier do nervo doador intacto (THAM, MORRISON, 1998; HAYASHI et al, 2004). A utilização de marcação retrógrada evidencia que, na TLT sem janela epineural, esta é a origem dos os axônios que reinervam o coto distal (KUBEK et al 2004; BONTIOTI et al, 2005).

1.4 Tubulização látero-terminal

Eventualmente, uma técnica cirúrgica que utilizava a interposição de um tubo entre na lateral do nervo doador foi desenvolvida, combinando os aspectos da TTT e da NTL. Denominamos este procedimento cirúrgico como tubulização látero-terminal (TLT). Estudos de outros grupos demonstraram que a TLT com segmento de veia e sem janela epi-perineural apresentou resultados comparáveis com a TLT com janela epineural, não sendo observada diferença significativa entre os grupos em relação ao número de fibras mielínicas e amielínicas após nove meses. Também não foi observada diferença no potencial de ação e na velocidade de condução dos impulsos nervosos (TING et al, 1998a; TING et al, 1998 b; HU et al, 1999). Outros grupos

realizaram experimentos de TLT com tubulização com a criação de janela epineural no nervo doador (ULKUR et al, 2003; MANASSERI et al, 2007; LEE et al, 2012).

No modelo da TLT sem janela epineural, (Nascimento-Elias, 2013), a origem das fibras que eventualmente reinervam o coto distal do nervo, seriam oriundos dos brotamentos colaterais a partir das fibras intactas do nervo doador para o interior do tubo, o que o tornaria ideal para estudar os brotamentos colaterais. Historicamente a TTT com tubos de silicone permitiu a observação de importantes aspectos da regeneração do nervo, que traduziram-se em avanços na engenharia de tecidos, com eventual aplicação clínica. Com base nisso decidimos utilizar os tubos de silicone para analisar a presença de células e proteínas associadas com a progressão temporal na regeneração na TLT e como ela se diferenciaria da TTT; a fase de acúmulo de fluido e síntese da MEC (fibronectina e laminina); a fase de vascularização (VEGF); a fase de multiplicação das células de Schwann (S100B, GFAP) e a fase de crescimento axonal no interior do tubo (GAP43).

1.5 Fibronectina

A fibronectina é uma glicoproteína da matriz extracelular, envolvida na migração, proliferação e diferenciação celular. Ela é encontrada em duas formas no organismo, a fibronectina plasmática produzida pelos hepatócitos e presente na forma solúvel no sangue na concentração de 300 µg/ml. A segunda forma é a fibronectina celular, produzida por diversos tipos de células, entre eles hematócitos, fibroblastos e macrófagos. Neutrófilos também produzem fibronectina durante as primeiras 24 horas pós lesão, mas param de secretá-la no segundo dia (KIGUCHI et al, 2014).

A fibronectina é composta por duas subunidades com peso molecular variando entre 220 a 250 kDA, conectadas por uma ponte de dissulfeto próxima do terminal C. Os monômeros apresentam uma estrutura constituída pela repetição de três tipos diferentes de sequências de aminoácidos denominadas módulos. Os módulos do tipo I, interagem com laminina, colágeno e heparina; o tipo II, que interage exclusivamente com colágenos; e tipo III, que liga-se a receptores celulares (STOFFELS et al, 2013). A síntese da fibronectina em humanos, ratos e camundongos é codificada por um único gene, mas devido ao mecanismo de *alternative splicing*, onde ocorre edição alternativa do mRNA antes da síntese das proteínas, a fibronectina apresenta de mais de 20 isoformas diferentes. A fibronectina plasmática não apresenta o módulo III na

sua composição, atuando apenas na fase inicial da formação da matriz de fibrina. Apenas a fibronectina celular sofre splicing alternativo para dar origem as diferentes variantes da proteína.

Além de interagir com outras proteínas da matriz extracelular, a fibronectina também interage com as integrinas, em especial as integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 4\beta 1$. As integrinas têm um papel fundamental na organização do sistema nervoso durante o período de desenvolvimento, com alterações na sua expressão na membrana celular regulando a adesão e a mobilidade das células da crista neural na fibronectina (STRACHAN, CONDIC, 2008). É observada colocalização da fibronectina e das integrinas com cadeias $\alpha 5$, $\alpha 4$ e $\beta 1$, assim como o aumento desses receptores em resposta a lesão no SNP. Em embriões a fibronectina é encontrada nas vias de migração das células da crista neural, eventualmente servindo como substrato para a migração das células precursoras das células de Schwann e do cone de crescimento dos nervos em desenvolvimento (PREVITALI et al, 2001).

A fibronectina fetal, ou embrionária, apresenta splicing alternativo nos sítios EIIIA, EIIIB e V, para formas denominadas EIIIA+; EIIIB+ e V+. A expressão dessas isoformas fetais diminui consideravelmente no período pós natal, sendo que 90 dias após o nascimento, EIIIB+ para de ser expresso completamente. Neste mesmo período, a expressão de EIIIA+ diminui de aproximadamente metade da quantidade de EIIIA total, para 11% no 90º dia pós natal (VOGELEZANG et al, 1999). Também ocorre aumento na expressão das isoformas V+ fetais, que continuam elevadas mesmo após três meses. Essas isoformas fetais são secretadas novamente, pelas células de Schwann em resposta a lesões no sistema nervoso periférico. EIIIA+, EIIIB+ e V+ tem sua expressão aumentada no primeiro dia após transecção ou esmagamento do nervo ciático, e continuam sendo expressadas em quantidade significativamente maior do que nos controles, mesmo 2 meses após lesões no sistema nervoso periférico (VOGELEZANG et al, 1999). É observado aumento de 600% na expressão na integrina $\alpha 5\beta 1$, quando comparado com controles não operados, uma semana após lesão do nervo ciático. As expressões desses receptores continuam em um nível significativamente superior ao encontrado nos controles não operados, mesmo 30 dias pós lesão (LEFCORT et al, 1992). Também ocorre acúmulo na fibronectina em câmaras de silicone, em modelo de tubulização do sistema nervoso periférico, nas primeiras 24 horas pós tubulização.

1.6 Laminina

Após o colágeno tipo IV, a laminina é o principal componente da membrana basal, a região da matriz extracelular que mantém contato direto com os receptores da membrana celular. As lamininas constituem uma família de proteínas heterotrômicas, formadas por três cadeias diferentes, um cadeia α , com 5 isoformas diferentes conhecidas, uma cadeia β ; que apresenta 4 isoformas, e uma γ , com 3 isoformas identificadas, resultando em 16 lamininas atualmente conhecidas (MCKEE et al, 2007). A laminina atua na manutenção da estrutura da matriz extracelular, provendo sítios de ligação para receptores da membrana celular, e por fim atuando como substrato para agregação celular (MINER, YURCHENCO, 2004; CHERNOUSOV et al, 2008). Os domínios LG1 – LG3 interagem com uma classe de receptores celulares denominadas integrinas, glicoproteínas de membrana, que atuam como intermediários entre as diferentes proteínas da matriz extracelular, entre elas a fibrina, colágeno, fibronectina e laminina; e os componentes do citoesqueleto, permitindo a adesão e a migração celular (AUMAILLEY ET AL, 2005). Os domínios LG4 e LG5 interagem com a α -destroglicana e heparana da membrana celular. A laminina também participa da homeostase e do desenvolvimento do sistema nervoso, sendo que a sua expressão precede o surgimento dos axônios pioneiros (CHEN, STRICKLAND, 2003). Mutantes que apresentam deleção no gene da laminina $\alpha 2$ exibem desmielinização de porções dos nervos motores, resultando em diminuição na velocidade de condução, embora esses animais possam apresentar superexpressão da laminina $\alpha 4$, o que atenua o fenótipo da mutação (CHERNOUSOV et al, 2008). A deleção da subunidade $\gamma 1$, presente em todas as laminina encontradas no sistema nervoso periférico - causa perda da sua capacidade de síntese, produzindo fibras nervosas com mielina extremamente fina, além de induzirem aumento substancial nas taxas de apoptose das células de Schwann (YU et al, 2005). A adição de laminina, *in vitro*, aumenta consideravelmente a aderência de células neuronais da linhagem PC12 em placas de cultura, tanto com a adição de quitosano, quanto sem (HSU et al, 2013). Tanto as lamininas, quanto as subunidades $\alpha 6$, $\alpha 7$ e $\beta 1$ das integrinas, que apresentam

alta especificidade para laminina, tem sua expressão aumentada após a transecção ou o esmagamento dos nervos periféricos.

A expressão das subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ (exclusivamente encontrada no perineuro) aumenta 48 horas após transecção e atinge um pico no quarto dia, decaindo no final do sétimo dia, e retornando aos níveis encontrados antes da lesão na segunda semana (DOYU et al, 1993). Walquist e colaboradores (2000), observaram aumento na expressão das subunidades $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ (Típicas da lamininas 1 e 2) três dias após a transecção do nervo isquiático, continuando elevadas por seis semanas, porém não foi observado aumento nessas subunidades quando houve esmagamento do nervo.

1.7 VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

As glicoproteínas da família VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) são indutores de mitose das células do tecido vascular, além de atuarem no controle da permeabilidade dos vasos sanguíneos (BAUTCH, 2012). A sua expressão é controlada principalmente pelo HIF-1 (hypoxia inducible factor), uma proteína heterodímera, formada pelas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β e que liga-se a uma região do VEGF denominada HRE (Hypoxia response element). Quando a concentração de oxigênio encontra-se em níveis normais, a subunidade HIF-1 α é degradada, mas em condições de hipóxia, como as causadas durante lesões (LI, ZHANG, KIRSNER, 2003), ocorre aumento na concentração de HIF-1 α , o que induz o crescimento de vasos sanguíneos para tecidos onde existe alta demanda de oxigênio (MATSUMOTO, EMA, 2014).

Então embora as proteínas da família VEGF sejam consideradas primariamente como fatores angiogênicos, ao menos dois membros deste grupo, VEGFA e VEGFB apresentam efeitos neuroprotetores e neurotróficos. O VEGFA, a primeira proteína do grupo a ser descoberta e a mais estudada, induz a regeneração axonal na tubulização término terminal (HOBSON et al, 2000) e inibi a apoptose causada por hipóxia em células do sistema nervoso (GÓRA-KUPILAS, JOSKO, 2005). O VEGFB é um fator angiogênico fraco quando comparado ao VEGFA, não atuando na permeabilidade dos vasos sanguíneos (LI et al, 2012). Porém, ele é um potente indutor do crescimento de neuritos e na regeneração do sistema nervoso periférico, e está associado com diminuição nas taxas de apoptose causadas por lesão (SUN et al, 2005; GUAQUIL et al, 2014). Esta relação entre o VEGF e o sistema

nervoso é ainda mais aparente quando se observam os efeitos que mutações no VEGF causam. Ratos com inserção de mutações na região HRE do VEGFA, apresentam degeneração dos axônios motores e atrofia muscular, resultando em um significativo déficit motor aos 7 meses de vida, quando comparado com animais sem mutações (OOSTHUYSE et al, 2001).

Lesões no sistema nervoso periférico danificam os capilares do endoneuro, induzindo a produção do VEGF. O esmagamento do nervo isquiático causa aumento na síntese do VEGF nos neurônios do gânglio da raiz dorsal, tão cedo quanto seis horas após a lesão, e sua expressão continua elevada por 96 horas, retornando aos níveis encontrados em animais submetidos à cirurgia placebo apenas no sétimo dia pós lesão (TANG et al, 2009, CAILLAUD et al, 2019). Pola e colaboradores (2004), observaram neovascularização intraneural no terceiro dia após esmagamento do nervo e persistindo até a segunda semana. A expressão do VEGF no nervo esmagado também foi marcadamente superior a do nervo controle, embora neste experimento a expressão do VEGF foi realizada apenas no sétimo dia pós lesão (POLA et al, 2004). A expressão atinge o seu pico ao redor de 30 dias, e continua elevada por ao menos dois meses (GUPTA et al, 2004). A imunohistoquímica nestes modelos de lesão demonstra a colocalização do VEGF com S100B, indicando que o VEGF também é produzido pelas células de Schwann (GUPTA et al, 2004; POLA et al, 2004). Em modelo de transecção com lacuna de 2 mm, foi observada a presença de vasos sanguíneos no cabo de regeneração no 2º dias pós lesão, aumentando consideravelmente em número no 3º dia. Essa vascularização é causada pela secreção de VEGFA por macrófagos, sendo que os vasos sanguíneos servem de guia para a migração das células de Schwann e a formação das bandas de Bungner que guiarão o crescimento axonal (CATTIN et al, 2015).

1.8 GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*)

O GFAP é um membro da família de proteínas conhecidas como Filamentos Intermediários (FIs). Essas proteínas recebem esta denominação por possuírem diâmetro médio de 10 nm (nanômetros), situado entre o diâmetro dos outros dois componentes do citoesqueleto, a actina (7 nm) e os microtúbulos formados por tubulina (25 nm) (MENCARELLI et al, 2011). A estrutura básica das subunidades dos FIs consiste em duas α -hélices organizadas em um eixo central, resultando em

uma estrutura conhecida como uma hélice superenrolada, com resquícios de aminoácidos, a c-terminal (carboxi-terminal) e o n-terminal (amino terminal) em ambas as extremidades da α -hélice. Essa estrutura e a sequência de aminoácidos da hélice superenrolada é altamente conservadas nos diferentes tipos de FIs, enquanto que o número e composição dos aminoácidos encontrados no c-terminal e n-terminal variam de acordo com os diferentes tipos de FI (PARRY et al, 2007). Essas unidades básicas de FIs formam protofilamentos, tetrâmetros com organização anti paralela; onde o c-terminal e o n-terminal são dispostos de maneira alternada, resultando em tetrâmetros com as duas extremidades iguais, enquanto os FIs propriamente ditos são formados pela junção de oito protofilamentos (PARRY et al, 2007).

Atualmente são conhecidas 5 classes de FIs, agrupadas de acordo com a sua estrutura comum e a função que desempenham. Os FIs de maior interesse para o estudo do sistema nervoso são as de tipo III e IV (GOLDMAN et al, 2012). As proteínas vimentina, desmina, GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) e periferina são classificadas como FIs de tipo III, sendo são capazes de formar longas da classe de FIs de tipo III encontrada no sistema nervoso de animais no período pós natal, consistindo na principal proteína de FIs encontrada nos astrócitos amadurecidos (ENG et al, 1971).

Inicialmente isolada de pacientes com esclerose múltipla, o GFAP é encontrado nos astrócitos do SNC, nas células de Schwann não mielinizantes e nas células da glia do sistema nervoso entérico (YANG, WANG, 2015). O GFAP é expressado na maioria dos astrócitos do SNC, com variações regionais, sendo que em diversas subpopulações de neurônios, sua expressão só atinge níveis detectáveis em resposta a condições de stress fisiológico. Durante o período de desenvolvimento embrionário, no sistema nervoso periférico, após o período pós natal, o GFAP é expressado apenas nas células de Schwann não mielinizantes, embora as células de Schwann mielinizantes mantenham a capacidade de sintetizar GFAP em resposta a lesões.

Animais com deleção para o gene do GFAP não apresentam alterações fenotípicas consideráveis, ocorrendo neste caso super expressão de outros FIs, a vimentina e a nestina, como mecanismo compensatório, garantindo o desenvolvimento normal dos animais (TRIOLO et al, 2006). Embora o GFAP não seja essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso de indivíduos saudáveis, sua deleção diminui a capacidade de proliferação das células de Schwann, resultando em

um decréscimo de 20% no número de fibras regeneradas, assim como diminuição no diâmetro médio dos axônios, quando comparado com animais normais (TRIOLO et al, 2006).

Estudos sobre a expressão do GFAP em resposta a lesão no sistema nervoso periférico observaram aumento na sua expressão para níveis acima dos encontrados em controles. Após transecção do nervo facial, ocorre considerável aumento na expressão do GFAP nas primeiras 24 horas, mantendo-se elevado durante o tempo experimental de 14 dias (JONES et al, 1997). Outros experimentos com esmagamento e transecção do nervo periférico também observaram aumento na expressão do GFAP no primeiro dia após a lesão, atingindo sua concentração máxima no quinto dia pós lesão, com leve diminuição no final da primeira semana (BERG et al, 2013). Resultados similares foram observados em um estudo com tubulização término terminal com lacuna de 2 mm, onde ocorreu aumento no número de células de Schwann expressando GFAP nos primeiros 5 dias pós tubulização (ZHANG et al, 2017). Após a lesão, o número de células que expressão GFAP continua elevado por ao menos duas semanas, sendo que Strafford e colaboradores (1990) observaram através de imunohistoquímica que o GFAP ainda está elevado no local da lesão 30 dias após o esmagamento do nervo. Embora ocorra aumento na expressão do GFAP nas primeiras semanas seguidas a lesão, foi observado que a transcrição do gene para proteína é atenuada quando ocorre desnervação crônica durante um período superior a 150 dias (STAFFORD et al, 1990; ALVARADO et al, 2012).

1.9 GAP43 (*Growth associated protein - 43*)

A proteína associada ao crescimento GAP43 (*Growth associated protein - 43*) é uma fosfoproteína intracelular encontrada nas células pré-sinápticas. Esta proteína foi identificada de maneira independente por vários grupos de pesquisa durante as décadas de 1970 e 1980, cada um deles observando e descrevendo aspectos parciais da funcionalidade, estrutura e expressão da proteína. Isto resultou em diversos nomes: GAP43, fosfoproteína PP 46, proteína F1, B-50 e neuromodulina, mas eventualmente estudos da sequência de aminoácidos e estrutura mostraram que na verdade se tratava de uma única proteína (SNIPES et al, 1987). A GAP43 apresenta em sua composição uma grande quantidade de resíduos de aminoácidos carregados negativamente – glutamina e aspartato, assim como aminoácidos apolares, com carga neutra – alanina

e prolina, resultando em uma proteína com carga altamente negativa (BASI et al, 1987). A presença de vários resíduos de prolina resulta em uma proteína com estrutura secundária alongada, quase sem ramificações. Essas características fazendo com que ela se desloque lentamente no gel de eletroforese, como uma proteína possuindo peso molecular aparente de 43 kDA, embora seu peso molecular verdadeiro seja de apenas 25 kDA (DENNY, 2006).

No sistema nervoso central, o GAP43 participa da endocitose e reciclagem das vesículas pré-sinápticas (HE et al, 1997), além da potenciação de longo termo, processo onde ocorre aumento da intensidade de resposta nas sinapses, após estimulação prolongada. Também é observada sua participação nos processos de brotamento axonal nas fibras da medula oblongata em resposta a lesão (CEBER et al, 2015). Após a transcrição, o GAP43, liga-se ao lado citosólico da membrana citoplasmática através de um processo conhecido como palmitolação, onde a adição de um ácido palmítico altera a conformação de proteínas, facilitando as interações com moléculas lipídicas (HOLAHAN, 2015). Em condições de repouso, onde os níveis de Ca^{2+} são baixos, a calmodulina está ligada ao sítio ativo da GAP43, mantendo o cone de crescimento estável. Quando ocorre aumento no nível de Ca^{2+} , a proteína quinase C se liga ao sítio ativo, modificando a estrutura da GAP43 e permitindo a sua interação com os filamentos de actina e as proteínas da membrana extracelular. Isto permite a fixação do cone de crescimento no substrato, guiando o seu crescimento (HOLAHAN, 2015).

O GAP43 é altamente expressado durante o desenvolvimento embrionário, atingem um pico na sua expressão na primeira semana pós natal em roedores, e retornam para níveis basais na sexta semana, conforme o sistema nervoso amadurece (BASI et al, 1987). Ainda é possível observar uma expressão elevada da GAP43 continua em regiões de alta plasticidade neuronal, como o hipocampo, o caudado putamen, cerebelo, bulbo olfatório e o neocortex; além dos neurônios da substância negra, do tronco encefálico e em toda a medula, especialmente no nível cervical e torácico. Após esmagamento ou transecção no SNP, o GAP43 retorna a ser super expressado, indicando um processo de regeneração. É possível observar aumento significativo na imunoreatividade contra GAP43 nos gânglios da raiz dorsal e no nervo alveolar 48 horas após a sua secção. A sua expressão continua elevada por ao menos quatro semanas no nervo alveolar, e oito semanas no gânglio trigêmeo (CEBER et al, 2015). Modelos de tubulização do nervo isquiático de longo prazo (12

semanas) demonstraram aumento de duas a dez vezes na área imunoreativa à GAP43, quando comparados com animais não operados, variando de acordo com o material utilizado para os tubos (CARRIEL et al, 2017). Também é observado aumento na expressão do GAP43 em modelos cirúrgicos onde são utilizados enxertos para o reparo de nervos lesionados, nos primeiros três dias após avulsão dos gânglios da raiz dorsal, de maneira consistente com o que é observado em outros modelos de lesão do sistema nervoso periférico (YUAN et al, 2009).

1.10 S100

As proteínas S100 constituem um grupo de carreadoras de cálcio, que apresentam uma estrutura terciária organizada em um padrão conhecido como “mão EF”. Essas proteínas recebem este nome devido a sua estrutura terciária, composta por duas hélices de RNA conectadas por um domínio globular, lembrando uma mão fechada com o indicador e o polegar estendidos (LEWIT-BENTLY, RÉTY, 2000; DONATO, 2001). Membros típicos desta família formam dímeros com peso molecular de aproximadamente 22 Kda, tornando as proteínas S100 em carreadores de cálcio e mensageiros secundários com baixo custo metabólico para sua síntese (MARENHOLZ, HEIZMANN, FRITZ, 2004). Os sítios ativos da proteína encontram-se no domínio globular, que apresenta dois sítios de ligação para Ca^{2+} , além de dois sítios para interação com outros metais, entre eles o zinco (Zn) e o cobre (Cu), cuja ativação influencia a afinidade ao cálcio do S100B. Essas proteínas também apresentam afinidade com o magnésio (Mg), que interage com os mesmos sítios de ligação para o Ca^{2+} , podendo provocar alterações na sua conformação ou na sua estabilidade.

Inicialmente isolada de extrato de cérebro bovino por Moore (1965), a proteína S100, posteriormente foi identificada como um heterodímero contendo as subunidades S100B e S100A1 (ISOBE, OKOYUMA, 1978) foi inicialmente considerada como tendo expressão exclusiva no sistema nervoso, em especial nas células da glia, e nas células de Schwann no sistema nervoso periférico, mas atualmente é conhecida a sua presença no tecido muscular esquelético, em adipócitos e no sistema entérico (ZIMMER, VAN ELDIK, 1987). Apesar disso, o S100 é amplamente utilizado como um marcador das células da glia e das células de

Schwann, especialmente as células de Schwann mielinizantes (MATA, ALESSI, FINK, 1990) .

O S100B é um dos pouco membros da família S100 com presença tanto no meio intracelular, quanto no meio extracelular, e apresenta a capacidade de formar homodímeros, ou heterodímeros com o S100A1, que também possui atividade no sistema nervoso. Em concentrações fisiológicas normais no interior das células, o S100B está envolvido na regulação do metabolismo energético, além da polimerização dos componentes do citoesqueleto. Ele interage com o sítio de ligação do GAP43, induzindo o crescimento dos microtúbulos, além de participar do processo de assembléia dos FIs, em especial o GFAP e a vimentina, sendo considerado neurotrófico quando está presente numa concentração nanomolar (SORCI et al, 2000). Porém em concentrações micromolares, o S100B inibe a fosforilação da tubulina e do GAP43, desestabilizando o citoesqueleto (SORCI, AGNELETTI, DONATO, 2000). No meio extracelular, o S100B liga-se no receptor de membrana RAGE (receptor for advanced glycation end products), encontrado nas células de Schwann. A interação do S100B com o RAGE, promove a migração das células de Schwann, através de um gradiente de concentração e induz a produção de fibronectina (SBAI et al, 2010). O S100B extracelular também induz a migração de macrófagos e linfócitos, e dependendo da sua concentração, induz uma resposta pró inflamatória (DONATO 2001; SCORCI et al, 2013).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Descrever a sequência de eventos celulares e moleculares na plasticidade do nervo tibial anterior nos intervalos de 24h, 48h e 96 horas na TLT

Objetivos específicos

Descrever as alterações morfológicas que ocorrem no nervo submetido à TLT nos intervalos de 24h, 48h e 96 horas após o procedimento cirúrgico.

Descrever a expressão e a localização das proteínas associadas ao reparo do nervo e sua regeneração comparando as técnicas de TTT e TLT nos intervalos de 24h, 48h e 96 horas

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas 66 ratas da linhagem Wistar, com peso entre 250-300 gramas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental (LNAE) do Departamento de Neurociências e Ciências do comportamento da FMRP. Antes das cirurgias, os animais foram mantidos em caixas plásticas (41cm x 34 x 16 cm) com no máximo 3 animais alocados por caixa, com acesso a água e ração *ad libitum*, em salas climatizadas (22-23°C) e com ciclo de luz de 12 horas. O projeto foi aprovado com o número de protocolo 156/15, pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USP-FMRP.

3.2 Grupos experimentais e controle

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais (tabela 1), a TLT e a TTT e um grupo controle, consistindo do nervo fibular retirado durante o cirurgia, para análise por microscopia óptica e imunohistoquímica e western blot.

Tabela 1. Grupos experimentais

	Microscopia Óptica (n)	Western Blot (n)
Grupo TLT 24 horas	5	6
Grupo TLT 48 horas	5	6
Grupo TLT 96 horas	5	6
Grupo TTT 24 horas	5	6
Grupo TTT 48 horas	5	6
Grupo TTT 96 horas	5	6
Grupo controle	5	6

Grupos experimentais e metodologias de análise. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal

3.3 Procedimento cirúrgico

Previamente à cirurgia os animais foram pesados, anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina 10% (75 mg/kg) e xilazina 2% (15mg/kg) e posicionados sobre mesa cirúrgica acrílica (30x18cm) em decúbito ventral. Foi realizada tricotomia e antissepsia do local da incisão com iodopolvidina 10%. O nervo isquiático direito e seus ramos tibial, fibular comum e sural foram expostos através de uma incisão na região postero-lateral da coxa. Utilizando um microscópio cirúrgico (D.F.Vasconcelos SA®) sob aumento de 16 vezes, o nervo fibular comum foi seccionado 3 mm abaixo da bifurcação do nervo isquiático, e um segmento adicional de 5mm foi retirado, para ser utilizado como o nervo fibular controle. Em seguida foram realizados os procedimentos cirúrgicos específicos de cada grupo.

3.3.1 Grupo experimental TLT

Um tubo de silicone chanfrado (Degania Silicone®) com 1,46 mm de diâmetro interno; 1,97 mm de diâmetro externo e 6 mm de comprimento foi suturado com dois pontos em U na lateral do nervo tibial com fio de sutura de nylon 10-0 (22 µm de espessura; agulha de 0,62 cm), 3 mm abaixo da bifurcação do nervo isquiático. O coto distal do nervo fibular foi então suturado na outra extremidade do tubo criando uma lacuna de 5mm entre o nervo doador e o nervo receptor. O coto proximal do nervo fibular foi transposto e suturado na pele, para evitar a inervação da musculatura adjacentes (Figura 1 A).

Figura 1. Cirurgia dos grupos experimentais. A- Esquema da cirurgia TLT. B - Esquema de cirurgia TTT. (a) - Nervo isquiático; (b)Coto proximal do nervo fibular (c) Nervo tibial; (d) Coto distal do nervo fibular; (e) nervo sural.

3.3.2 Grupo experimental TTT

Os cotos proximal e distal do nervo fibular foram suturados usando um tubo de silicone (Degania Silicone®) com 1,46 mm de diâmetro interno; 1,97 mm de diâmetro externo e 6 mm de comprimento com fio de sutura de nylon 10-0. Assim como na TLT, foi retirado um segmento de 5 mm do nervo fibular, criando uma lacuna de 5 mm no interior do tubo de silicone (Figura 1 B). Após o término da cirurgia o músculo isquiotibial e a pele foram fechados com fio de sutura mononylon 4.0 (Shalon).

3.3.3 Cuidados pós operatórios

Após a cirurgia os animais foram alojados individualmente em caixas de plástico, onde tiveram livre acesso à água e ração. Meio comprimido de Paracetamol (0,75 mg/ml) foi adicionado à água nas primeiras 48 horas pós cirurgia para reduzir a dor dos animais. Foi realizada anti-sepsia diária com iodopolvidina 10% no local da incisão, até o momento das cirurgias para coleta de material, ou quando os animais apresentaram boa cicatrização. Objetos para enriquecimento ambiental foram adicionados nas gaiolas, com o objetivo de reduzir o stress do isolamento dos animais e diminuir o comportamento de *grooming* que poderia causar a abertura dos pontos.

3.4.1 Coleta do material para inclusão em parafina

Ao término do período de observação de cada um dos grupos, os animais foram anestesiados e imobilizados em mesa cirúrgica acrílica. Os pontos com fio de nylon da pele e músculo foram removidos, e o nervo isquiático e seus ramos foram expostos. Para a imunohistoquímica e microscopia óptica foram retirados segmentos de nervos contendo; na TTT; o nervo fibular, com os seus cotos proximal e distal e o tubo de silicone e, na TLT, foram retirados o nervo tibial, e o tubo de silicone e o coto distal do nervo fibular. Após a sua retirada, os fragmentos de nervo foram fixados em paraformaldeído 4% (pH 7,4) por um período mínimo de 48 horas em temperatura ambiente e em seguida armazenadas em álcool etílico 70%, para subsequente desidratação e inclusão em parafina. Antes da inclusão os nervos foram fracionados.

Na TTT (figura 2 A), um fragmento de 3 mm do nervo fibular distal, seccionado imediatamente abaixo da bifurcação do nervo isquiático; o cabo de regeneração e a um fragmento de 5 mm do fibular distal. Na TLT (Figura 2B), uma porção tibial de 6 mm de comprimento, seccionada 3 mm acima da região de implantação do tubo e mais 3 mm distalmente; o cabo de regeneração e um fragmento de 5 mm do nervo fibular distal. Os fragmentos foram transferidos para cassetes histológicos com tampa removível e estocados novamente em solução de álcool etílico 70%. Após a coleta do material, a eutanásia dos animais foi realizada em câmara de CO₂.

Figura 2. Pontos de coleta do material dos grupos experimentais para análise por IHQ e microscopia óptica. (A) - segmentos do nervo submetido a TTT, com as regiões coletadas para análise discriminadas. (B) - Segmentos do nervo submetido a TLT, com as regiões coletadas para análise delimitadas.

3.4.2 Inclusão em Paraplast e cortes histológicos

Os fragmentos de nervo foram retirados do álcool etílico 70%, e submetidos a um processo de desidratação crescente em álcool etílico e xileno e subseqüentes banhos em Paraplast em temperatura dentre 56 e 58°C; de acordo com os tempos descritos na tabela 2.

Tabela 2. Sequência de tratamentos para a inclusão em parafina

Banho	Duração
Álcool etílico 80%	30 minutos
Álcool etílico 95%	30 minutos
Álcool etílico 100%	2 horas e 30 minutos
Xilol 1º banho	30 minutos
Xilol 2º banho	30 minutos
Paraplast 1º banho	1 hora
ParaPlast 2º banho	1 hora
Paraplast 3º banho	2 horas

Tempos de tratamento para inclusão do material em Paraplast.

Após a terceira imersão em Paraplast, os fragmentos de nervo foram retirados dos cassette histológico, e sob uma platina aquecida, posicionados em moldes metálicos, preenchidos com Paraplast e deixados para resfriar em temperatura ambiente. As secções histológicas para a microscopia de foram feitas com 5 µm de espessura e obtidas utilizando um micrótomo convencional Carl Zeiss. Os cortes para imunohistoquímica foram coletados em lâminas silanizadas Starfrost.

3.4.3 Coloração de Hematoxilina - Eosina e Dominici

Para a microscopia descritiva foram utilizadas as colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) e a coloração de Dominici, para observar a presença de células inflamatórias. Os cortes foram submetidos a processo de desparafinização e hidratação, em três banhos de xilol de 10 minutos, e três banhos em álcool etílico nas concentrações de álcool etílico 100% - 3 minutos; álcool etílico 90% e álcool etílico 80% - 3 minutos. Após o processo de hidratação, as lâminas foram colocadas em água corrente durante três minutos e seguiram um processo diferenciado de acordo com a coloração utilizada.

Para a coloração com HE, as lâminas foram submetidas a uma bateria com hematoxilina por 7 minutos, água corrente por 2 minutos, eosina por 7 minutos, álcool etílico 80% e álcool etílico 90%.

Para a coloração de Dominici, as laminas foram colocadas em corante de Dominici por 5 minutos, submergidas rapidamente em álcool 60%; coradas com azul de toluidina 0,5% e submergidas em álcool 95%.

Após este passo as lâminas foram submetidas a imersão em álcool etílico 100%, e três passagens de 3 minutos em xilol para diafanização. Após a última passagem em xilol, lamínulas foram montadas sobre as lâminas com Entelan.

3.5 Imunohistoquímica

Para a IHQ foram utilizados cortes histológicos de 3 animais diferentes, com um nervo fibular sadio servindo de controle interno dos grupos. Para a validação dos anticorpos, foram usados tecidos expressando as proteínas de interesse, descritos na tabela 3, como controle positivo, tratados com o anticorpo primário, e controles negativos, que não receberam anticorpos primários.

As lâminas foram submetidas a um processo de desparafinização em xilol e álcool etílico das lâminas para a imunohistoquímica seguiu inicialmente H.E. e Dominici. Após estes passos as lâminas foram submergidas em água destilada durante 1 minuto e submetidas a bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 10% em metanol, seguida por duas lavagens de 10 minutos com água corrente e uma com água destilada durante 1 minutos.

As lâminas que foram incubadas com anticorpos policlonais (fibronectina e laminina) foram submetidos a bloqueio com albumina do soro bovino diluída em água destilada por 15 minutos; enquanto as que receberam anticorpos monoclonais (GFAP, GAP43, VEGF, S100) foram submetidos a bloqueio com leite em pó 5% em PBS por 30 minutos. Após este bloqueio as lâminas foram lavadas com água corrente por 3 minutos, água destilada durante 1 minutos e lavadas com PBS durante 5 minutos. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em PBS-T durante 2 horas em câmara húmida à 37°C. Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Anticorpos utilizados na IHQ

Anticorpo	Diluição	Controle	Tipo	Marca e código
Fibronectina	1:1000	Fígado	policlonal coelho	abcam – ab2413
Laminina	1:1000	Pele	policlonal coelho	abcam – ab128053
VEGF	1:50	Coração	monoclonal camundongo	Santa Cruz Biotechnology– sc7269
GAP43	1:100	Cérebro	monoclonal camundongo	Santa Cruz Biotechnology, – sc17790
S100	1:100	Cérebro	monoclonal camundongo	Novus Biologicals – NB600-563
GFAP	1:100	Cérebro	monoclonal coelho	abcam – ab68428

Lista de anticorpos, diluições e controles positivos utilizados para análise das proteínas por IHQ.

Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram submetidas a duas lavagens com PBS-T por 5 minutos, incubados nos anticorpos secundários durante 30 minutos em temperatura ambiente e lavados com PBS durante 5 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas com streptavidina por 30 minutos e lavadas com PBS por 5 minutos. A revelação foi feita com DAB 2% durante 2 minutos. Para o bloqueio da revelação foi adicionado água destilada durante 5 minutos, água corrente por 3 minutos. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina por 5 minutos, lavadas com água corrente e diafanizadas em xilol para a montagem das lâminas com entelan.

3.5.1 Digitalização e análise das imagens de imunohistoquímica

A captura e digitalização das imagens foi feita utilizando um computador com o software AxioVision 4.8 (Zeiss), um microscópio CarlZeiss com platina motorizada acoplada e uma câmera digital MR3 (Zeiss). Os quadros foram obtidos com aumento de 320 vezes, dimensões de 1388 x 1040 pixels, função de controle automático da intensidade de luz (Autolive), balanço de branco ativada e definição de 150 dpi (dots per inch). Utilizando a função Mosaic Aquisition, uma matriz de quadros da região de implantação dos tubos foi obtida, com área total de aproximadamente 5 mm², perfazendo entre 80-85 quadros.

Para análise das imagens foi utilizado o programa ImageJ (National Institutes of Health) com o plugin Color Deconvolution instalado desenvolvido por Ruifrok e

Johnston (2001). A partir desse plugin foi desenvolvida uma macro com os seguintes comandos:

```
run("Subtract Background...", "rolling=50 light");  
run("Colour Deconvolution", "vectors=[H DAB]");  
setAutoThreshold("Default");  
//run("Threshold...");
```

O comando Subtract Background foi utilizado para eliminar resíduos de fundo e tornar as imagens homogêneas, enquanto que o comando Color Deconvolution foi utilizado para decompor as imagens em três canais de cores (figura 3A), com o canal 1 (3B) consistindo da coloração com hematoxilina; o canal 2 consistindo da marcação com DAB (3C) e o canal 3 consistindo em marcação residual (3D).

Figura 3. Processamento digital das imagens para imunohistoquímica. Após a utilização da macro, a imagem original (A) é decomposta em 3 imagens distintas representando diferentes limiares de cor. (B) - Canal 1, consistindo no intervalo de cores identificado como a coloração de HE. (C)- O Canal 2 consiste no intervalo de cores marcados pela coloração DAB, identificando a proteína de interesse marcadas pela IHQ. (D) O canal 3 consiste no intervalo de cores residuais que não corresponde a uma marcação específica.

Para as proteínas que são encontradas no meio extracelular - S100; VEGF, fibronectina e laminina foram medidas a fração da área do quadro marcada pelo DAB no canal 2 e a intensidade do valor médio de cinza (VMC). Para as proteínas encontradas no meio intracelular - GAP43 e GFAP, medimos apenas o VMC.

O VMC é um valor entre 0-255; sendo que quanto menor a intensidade da coloração, maior será o valor do VMC. Para corrigir isto, foi utilizada a seguinte formula para determinar a densidade óptica (DO) da marcação do DAB:

$$DO = 255 - VMC$$

Para a análise estatística foram medidos 5 quadros de três animais diferentes (n=15) de cada um dos componentes dos nervos. Os quadros foram sorteados aleatoriamente. Quando um quadro apresentou menos de 10% da sua área preenchida, como por exemplo na borda do nervo, outro quadro foi selecionado.

3.6 Western Blot

Após o período de observação experimental, os animais foram anestesiados e submetidos a uma segunda cirurgia para coleta do material. Inicialmente, o fluido condicionado acumulado no interior do tubo foi coletado utilizando uma micropipeta de 10 µL. Idealmente, um tubo de silicone vazio de diâmetro interno de 1,46 mm x 6 mm de comprimento possui um volume nominal de 10,31 µL; consequentemente, uma micropipeta de 10 µL foi considerada adequada para a coleta do fluido. Uma pinça curva foi posicionada abaixo do tubo de silicone e utilizada para isolá-lo da musculatura adjacente, evitando a contaminação da amostra com fluido sinovial. A ponteira foi inserida dentro do tubo e o fluido foi lentamente coletado. Em seguida, o tubo foi aberto com uma tesoura para permitir a visualização do cabo de regeneração e dos pontos de inserção do tubo. Após o período de 24 horas, coletamos amostras apenas dos animais que apresentaram formação de cabo de regeneração sólido.

Nos animais do grupo TTT, o fluido condicionado acumulado na luz dos tubos de silicone, e quando observado, o cabo de regeneração unindo os dois nervos. Nos animais do grupo TLT, foi removido o fluido condicionado acumulado na luz dos tubos de silicone, e quando observado, o cabo de regeneração unindo os dois nervos. Também foram coletados os nervos tibial, fibular proximal e fibular distal, mas não

fizemos a análise dos dados neste momento. As amostras foram estocadas em tampão de lise - (HEPES 10mM pH 7.9, cloreto de magnésio (MgCl_2) - 1,5 mM, KCl - 10 mM, EDTA - 1 mM, glicerol - 10%, NP40 - 1% e inibidor de protease 2% (Protease Inhibitor Cocktail – 08340; Sigma) e estocadas em freezer à -80°C . Após a coleta do material, a eutanásia dos animais foi realizada em câmara de CO_2 .

3.6.1 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Para análise, foi feito um pool de amostras derivadas dos 6 animais de cada grupo, e maceradas em um homogeneizador de tecidos (PowerGen 125; Fisher Scientific). Para determinar a concentração de proteínas totais, foram pipetados 4 μL de amostra e 196 μL de solução de Bradford 20% em água deionizada em uma microplaca de 96 poços. A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino diluída em NaCl 0,9%; nas concentrações 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,8 mg/mL e 1,0 mg/mL. A leitura foi feita por espectrofotometria, em leitora de placas de ELISA com comprimento de onda de 630nm. Uma equação de regressão foi obtida a partir dos resultados do padrão de albumina e utilizada para calcular as concentrações de proteínas presentes nas amostras, padronizando a quantidade de proteínas aplicadas para 50 μg em cada grupo.

3.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)

Para o desenvolvimento do Western blot foi preparado um gel de SDS-PAGE, com concentração variando de acordo com o peso molecular das proteínas a serem estudadas. Apenas uma repetição foi feita por grupo experimental. As concentrações para o gel de SDS-PAGE foram escolhidos de acordo com o peso molecular dos anticorpos utilizados, sendo de 7% (SDS - 0,01 mM; Trizma - 1,59 mM ; H₂O MilliQ - 5,1 mL; Acrilamina Bis 30% - 2,3 mL; APS 20% - 25 μL ; TEMED - 10 μL) e 10 % (SDS - 0,025 mM; Trizma - 3,98 mM; H₂O MilliQ - 4,2 mL; Acrilamina Bis 30% - 3,3 mL; APS 20% - 30 μL ; TEMED - 10 μL). A concentração do gel e o controle positivo utilizados encontram-se descritos na tabela 4.

Tabela 4. Anticorpos primários utilizados no Western Blot

Anticorpo	KDa	Tipo	Controle Positivo	Marca e código	% gel SDS-PAGE
Fibronectina	262 KDa	Policlonal coelho	Fígado	Abcam – ab2413	7%
Laminina	171 KDa	Policlonal coelho	Pele	Abcam – ab128053	7%
VEGF	15 KDa	Monoclonal camundongo	Artéria	Santa Cruz Biotechnology – sc7269	10%
GAP43	28 KDa	Monoclonal camundongo	Cérebro	Santa Cruz Biotechnology – sc17790	10%
S100	21 KDa	Monoclonal camundongo	Cérebro	Novus Biologicals – NB600-563	10%
GFAP	50 KDa	Monoclonal coelho	Cérebro	Abcam – ab68428	10%

As amostras foram solubilizadas em tampão Laemmli (BioRad) com 5% de β -mercaptoetanol (BioRad) em proporções iguais (amostra + mix), aquecidas à 95°C por 5 minutos e aplicadas nos poços do gel, de acordo com o esquema da figura 4. Juntamente com as amostras dos grupos experimentais, foram alocados quatro poços para a adição um padrão de pesos moleculares Kaleidoscopic (BioRad), um controle positivo que variou de acordo com cada um dos anticorpos estudados, um controle negativo contendo apenas 10 μ l de tampão Laemmli e 5% 2-mercaptoetanol e o nervo fibular distal como controle interno dos grupos.

O gel foi inserido em um aparato de eletroforese Mini-Protean Tetra System (Bio Rad) e imerso em tampão de corrida (pH 8,3; Trizma 13,2 mM; glicina 9,8 mM; SDS 1,4 mM; H₂O MilliQ 1000 mL). O aparato foi conectado a uma fonte de energia PowerPacktm HC (BioRad) e a eletroforese vertical foi iniciada sob voltagem constante de 100V por 30 minutos e 150V por 1 hora e 30 minutos.

Após o término da eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de PVDF, ativada por imersão em metanol por 60 segundos. O gel foi colocado em contato direto com a membrana de PVDF, tipo sanduíche, imerso em tampão de transferência (pH 8,4; Trizma - 52,8 mM; glicina - 98mM; H₂O MilliQ - 200 mL; etanol - 800 mL) à 4°C, e a transferência foi realizada sob corrente de 100V por 1 hora.

Figura 4. Esquema dos grupos experimentais do Western Blot. KLD - Padrão de peso molecular Kaleidoscopic, utilizado para mostrar o peso molecular das amostras; + controle positivo da proteína; - controle negativo; FIB - nervo fibular controle; TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

3.6.4 Imunodeteccção

Após o término da transferência, a membrana de PVDF foi imersa em solução de bloqueio feita com 5% de leite em pó desnatado, 5% de soro fetal bovino (SFB) diluído em tampão TBS-T (TBS + 0,1% de Tween 20), sob agitação constante por 30 minutos. Posteriormente a membrana foi submetida a três lavagens de 5 minutos com TBS-T. Em seguida a membrana foi imersa em anticorpo primário diluído 1:1000 em TBS-T durante 1 hora em temperatura ambiente sob agitação constante. Posteriormente a membrana foi submetida a três lavagens de 5 minutos com TBS-T. A membrana foi imersa por 30 minutos em anticorpo secundário biotilado diluído 1:1000 em TBS-T em temperatura ambiente, sob suave agitação. Em seguida, submetida a três lavagens com TBS-T, de 5 minutos cada uma. Uma incubação com streptavidina durante 15 minutos foi realizada, seguida por três lavagens de 5 minutos com TBS-T, e finalmente, foram adicionados 8 mL de substrato de membrana TMB para detecção das bandas resultantes.

Em seguida, a membrana de PVDF foi scaneada e convertidos em uma imagem com escala de cinza de 16 bits. De pose das imagens, o valor médio de cinza foi

calculado utilizando o programa ImageJ. Através do valor médio de cinza foi calculada a densidade óptica relativa, com a seguinte formula:

$$DO = 255 - VMC$$

Para normalizar os valores dos experimentos de western blot, o nervo fibular controle foi utilizado como padrão de referência para sua respectiva membrana e com isso a densidade relativa (DR) foi obtida:

$$DR = \frac{DO_{amostra}}{DO_{nervofibular}}$$

3.7 Análise estatística

Os dados quantitativos da IHQ foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Foi utilizada o teste ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey, para identificar as diferenças entre a área e a DO, entre os grupos experimentais - TLT e TTT; entre os diferentes componentes do nervo - nervo tibial, nervo fibular proximal, nervo fibular distal e cabo de regeneração, e diferentes tempos experimentais. Diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Como apenas uma repetição foi feita para os experimentos de western blot, fizemos apenas a descrição dos dados nos resultados.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Aspectos macroscópicos

Não foi observada formação de cabo de regeneração unindo os dois cotos do nervo fibular nas primeiras 24 horas. Da mesma maneira, não foi observada a formação de cabo de regeneração unindo o nervo tibial e o coto distal do nervo fibular nos animais submetidos a TLT. A partir das 48 horas pós cirurgia, ocorreu a formação de cabos de regeneração, compostos, unindo os cotos proximal e distal do nervo fibular em oito dos onze animais operados (cinco do grupo IHQ e seis do grupo Western Blot), representando uma taxa de sucesso da regeneração de 72%. Na TLT 48 horas, todos os onze animais desenvolveram cabos de regeneração. No período de 96 horas, todos os animais apresentaram a formação de um cabo de regeneração unindo o coto do nervo fibular distal com o nervo tibial na TLT, ou com o coto do nervo fibular proximal na TTT.

4.2 - Histologia descritiva - 24 horas

4.2.1 TLT - 24 horas

A TLT 24 horas (Figura 5A) foi caracterizada pelo acúmulo de uma densa malha de proteínas fibrosas crescendo na região da implantação do tubo de silicone no nervo tibial, precedendo o desenvolvimento do cabo de regeneração encontrado nos tempos posteriores (Figura 5B). Esta região apresentou um grande número de células inflamatórias, predominantemente de neutrófilos e alguns macrófagos, além da presença de um número pequeno de hemácias. A sutura aparentemente não causou danos no epineuro, com presença de células inflamatórias muito menor e ausência de hemácias indicando que a microvasculatura do nervo tibial não foi lesionada (Figura 5C).

Figura 5. (A) Nervo tibial na TLT 24, quadros indicam as regiões onde foram tiradas as fotos ampliadas, coloração de HE. (B) Acúmulo de malha composta de proteínas fibrosas na região de implantação do tubo de silicone, é observada a presença de hemácias e células inflamatórias, especialmente neutrófilos. (C) Nervo tibial ainda apresenta o epineuro intacto, sem células inflamatórias ou hemácias findas da circulação. Coloração de H.E. barra de 20μm.

No coto fibular distal (Figura 6A) foi observada acúmulo de células no epineuro, porém não apresentaram morfologia de células inflamatórias, além de presença de hemácias na extremidade do nervo (Figura 6B).

Figura 6. (A) Nervo fibular distal do grupo TLT 24 horas. (B) Foi observada a presença de hemácias na extremidade do coto fibular distal, assim como um elevado número hemácias no epineuro. * marca concentração de hemácias. Coloração de H.E. Barra de 10µm.

4.2.2 TTT - 24 horas

O coto proximal do nervo fibular (Figura 7A) apresentou acúmulo de matriz fibrina na sua extremidade formação do cabo de regeneração na TTT teve início no período de 24 horas. Foi observado grande número de hemácias na Coto proximal do nervo fibular – após 24 horas de tubulização término-terminal. Foi observada a presença de um pequeno número de células polinucleadas no interior do nervo, embora hemácias estejam largamente ausentes (Figura 7B).

Figura 7. Coto proximal do nervo fibular TTT - 24 horas. (A) Início da formação de um cabo de regeneração a partir do coto proximal, com presença de matriz extracelular e elevado número de células polimorfonucleadas e hemácias. (B) Também são encontrado alguns neutrófilos no endoneuro (*), mas em quantidade menor do que as menor do que no cone de crescimento, e hemácias estão ausente. Coloração de H.E. Barra de 10 μ m.

A matriz de fibrina apresenta elevado número de neutrófilos, com início da formação de um cabo de regeneração a partir do coto proximal, com presença de matriz extracelular e elevado número de células polimorfonucleadas e hemácias (8A e 8B).

Figura 8. Matriz de fibrina na TTT 24 horas. (A) Com presença de matriz extracelular e elevado número de células polimorfonucleadas e hemácias. Quantidade neutrófilos no endoneuro é elevada, mas menor do que no cone de crescimento, e hemácias estão ausentes. Barra de 10 μ m. (B) Coloração de Dominici permite observar o núcleo polimorfonucleado dos neutrófilos Barra de 20 μ m.

Foi observado o início do processo de degeneração das fibras no coto do nervo fibular distal, e acúmulo de matriz fibrosa, embora em quantidade muito menor do que no nervo fibular proximal. (Figura 9 A e 9B). Podemos observar pela coloração de Dominici que as células inflamatórias ainda não atingiram o coto distal (9C).

Figura 9. Coto fibular distal TTT 24 horas. (A) É observado acúmulo de matriz fibrosa na extremidade do coto e fibular distal. (B) O processo de degeneração das fibras nervosas têm início. (C) Ainda não é observado presença de células inflamatória na extremidade do coto fibular distal. Barra de 20 μ m.

4.3 - Histologia descritiva - 48 horas

4.3.1 TLT - 48 horas

O nervo tibial apresentou elevado número de células inflamatórias na região de implantação do nervo tibial, juntamente com hemácias. A matriz de fibrina no ponto de implantação do nervo é densa, e confunde-se com o epineuro (Figura 10 A e 10 B).

Figura 10. (A) Nervo tibial do grupo TLT-48 horas. Foi observada densa matriz de fibrina no ponto de implantação do tubo. (B) Região destacada em aumento, apresenta grande número de células inflamatórias.

O cabo de regeneração da TLT 48 horas (Figura 11A), apresentou rica matriz de fibrina proximalmente ao nervo tibial, com elevado número de neutrófilos, mas poucas hemácias (Figura 11B). Conforme observamos a progressão do cabo em direção ao coto fibular distal, a matriz fica menos densa, e o número de células inflamatórias diminui (Figura 11C).

Figura 11. Cabo de regeneração da TLT 48 horas. (A) Foto de campo do cabo de regeneração, quadros indicam as regiões que foram fotografadas em aumento maior. (B) Imagem da matriz proximalmente ao nervo tibial, densa e com aglomerado de macrófagos. (C) Matriz é menos densa distalmente ao nervo tibial, e os neutrófilos estão em menor quantidade. * indica presença de neutrófilos. Coloração de Dominici. Barra de 20 μm .

O nervo fibular distal na TLT 48 horas apresentou padrão de degeneração similar ao encontrado durante às 24 horas (Figura 12 A). As fibras estão em processo de degeneração (Figura 12 B), porém o epineuro do coto distal continua livre de células inflamatórias (Figura 12 C) .

Figura 12. Nervo fibular distal na TLT 48 horas. (A) Nervo apresenta processo de degeneração das fibras na extremidade do coto fibular distal. (B) Fibras em processo de degeneração. (C) não são observadas células com o perfil característico de neutrófilos no endoneuro. Coloração de Dominici. Barra de 20μm

4.3.2 TTT - 48 horas

É possível observar a retração do endoneuro do nervo fibular proximal na TTT 48 horas (Figura 13 A e B) , além de alta quantidade de hemácias no interior do nervo, que não foram observadas no períodos anteriores. (Figura 13 C).

Figura 13. (A) Nervo fibular proximal na TTT 48 horas. Barra de 200µm., coloração de HE. (B) É observada a retração das fibras na extremidade do nervo fibular, (C) além de hemácias ao redor dos vasos. Coloração de H.E. Barra de 40µm.

No período de 48 horas, ainda é possível observar grande número de células inflamatórias no cabo de regeneração (Figura 14 A e B). O cabo de regeneração da TTT 48 horas apresentou alto número de hemácias, consideravelmente maior do que o encontrado na TLT 48 horas.

Figura 14. (A) Cabo de regeneração da TTT 48 horas, apresenta elevado número de hemácias na sua extremidade. (B) Região com aumento, apresenta (*) hemácias e células, com adensamento da matriz de fibrina quando comparada com o período de 24 horas. Coloração de HE. Barra de 40µm.

O nervo fibular distal na TTT 48 horas apresentou um padrão similar ao da TLT 48 horas, com acúmulo de matriz de fibrina na extremidade do coto (Figura 15 A), e presença de células inflamatórias (Figura 15 B). É possível ver a infiltração de células no interior do epineuro do coto distal, em número muito maior do que no período de 24 horas e do que na TLT 48 horas.

Figura15. (A) Nervo fibular distal na TTT 48 horas. (B) Acúmulo de matriz de fibrina com células inflamatórias e hemácias na sua extremidade. Fibras em processo de degeneração. (C) Nervo apresenta processo de degeneração das fibras na extremidade do coto fibular distal, e um elevado número de células no epineuro. Coloração de HE.

4.4.1 Histologia descritiva - 96 horas

4.4.2 - TLT - 96 horas

No período de 96 horas pós tubulização, inicia-se o processo de neovascularização a partir do do nervo tibial doador (Figura 16 A e 16B). O epineuro apresenta um grande número de células, com vasos protundindo pelo epineuro e penetrando na região de implantação do tubo de silicone.

Figura 16. (A) Nervo tibial da TLT 96 horas. Início do processo de neovascularização é observado a partir do nervo tibial doador. (B) A redor dos vasos é observado grande quantidade de células(*). Barra de 20 μ m.

A polimerização da matriz de fibrina na TLT 96 horas continuou a acontecer no cabo de regeneração (Figura 17 A), com a matriz proximal ao ponto de implantação mais densa e com maior número de células (Figura 17 B). A matriz está mais uniforme quando comparada com o período de 48 horas, mas a quantidade de células que atingiram a parte distal ainda é pequena (Figura 17 C).

Figura 17. (A) Cabo de regeneração da TLT 96 horas, apresenta elevado número de hemácias na sua extremidade. (B) Matriz é mais densa proximalmente ao ponto de implantação do tubo, com alto número de hemácias e células inflamatórias. (C) A densidade e o número de células diminui conforme o cabo progride em direção ao coto fibular distal. Coloração de HE. Barra de 20 μ m.

4.4.3 TTT - 96 horas

Foi observado o início da formação de vasos sanguíneos na extremidade do coto fibular proximal, penetrando na região do cabo de regeneração no período de 96 horas (Figura 18 B). Hemácias são observadas no interior desses vasos (Figura 18 C).

Figura 18. (A) Coto fibular proximal 96 horas. (B) Início da formação de vasos sanguíneos, penetrando a matriz do cabo de regeneração. (C) Vasos apresentam hemácias no seu interior (*). Coloração de HE.

A polimerização da matriz de fibrina continuou a acontecer no cabo de regeneração (Figura 19 A), principalmente em direção ao coto fibular distal, que apresentou aspecto mais uniforme. Células inflamatórias e hemácias estão migrando pelo cabo para o nervo fibular distal (Figura 19 B). Neste período quase não se encontram células inflamatórias no coto fibular proximal (Figura 19 C) .

Figura 19 (A) cabo de regeneração do grupo TTT 96 horas. (B) Matriz próxima ao nervo fibular distal é mais densa e apresenta neutrófilos e hemácias. (C) Matriz está bem distribuída, poucos neutrófilos são encontrados na região de implantação do tubo, longo do tubo.

As fibras nervosas do nervo fibular distal continuaram a sofrer processo de degeneração, tanto na TTT 96 horas (Figura 20 A, 20B), quanto na TLT 96 horas (Figura 20 C e 20 D) já sendo possível observar aglomerados de mielina na extremidade do nervo.

Figura 20. Coto fibular distal 96 horas. Extravazamento das fibras nervosas é observado tanto na TTT (A), quanto na TLT (C) . Ovoides de mielina ocorre na ponta do nervo (*), na TTT (B) e n TLT (D) Nervos também apresentam maior número de células o seu endoneuro. Coloração de HE. Barra de 20 μ m.

4.5.1 Fibronectina - Western Blot

Foi observado aumento considerável na densidade relativa (DR) no fluido condicionado da TLT 24 horas (220,1%) e na TTT 24 horas (158,4%) (Figura 19; tabela 5). A quantidade de fibronectina expressada no fluido condicionado decaiu no período de 48 horas em ambos os grupos, para 84% (TLT 48 horas) e 97% (TTT 48 horas). A quantidade de fibronectina expressada no fluido condicionado aumentou em ambos os grupos, quando comparado com o período de 48 horas, para 233,8%% na TLT 96 horas e 218,5% na TTT 96 horas (Figura 21).

No cabo, a DR da fibronectina foi 69,9% no grupo TLT 48 horas e de 94,2% no grupo TTT 48 horas. No período de 96 horas, a expressão da fibronectina no cabo foi 94,1% (TLT 96 horas) e de 124,2% (TTT 96 horas).

Figura 21. Densidade relativa da fibronectina por Western Blot. O nervo fibular controle foi utilizado como referencial para normalizar os valores dos grupos experimentais. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

Tabela 5. Densidade relativa da fibronectina

	Cabo	Fluido Condicionado
TLT24		2,201
TLT48	0,699	0,840
TLT96	0,941	2,338
TTT24		1,584
TTT48	0,942	0,942
TTT96	1,242	2,185

Densidade relativa da fibronectina por Western Blot. O nervo fibular controle foi utilizado como referencial para normalizar os valores dos grupos experimentais. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.5.2 Fibronectina - Fração da área

Os cabos de regeneração apresentaram área marcada pela fibronectina similar à encontrada no nervo controle, tendo distribuição significativamente maior do que os seus respectivos nervos (Figura 22; tabela 6). Não foi observada diferença significativa na área marcada por IHQ entre os nervos tibial e fibular proximal tanto na TLT quanto na TTT. O nervo fibular distal do grupo TLT apresentou em geral uma menor área marcada que a dos grupos de TTT, embora a diferença não tenha sido considerada estatisticamente significativa.

Figura 22. Fração da área marcada da fibronectina por IHQ. Dados apresentados como média mais desvio padrão. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. * Representa diferença significativa em relação ao controle. = Representa que não foi observada diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 6. Fração da área da fibronectina

	Tibial/Fibular proximal	Cabo	Fibular distal
Nervo controle	41,06 ± 3,86 A B		
TLT 24 horas	33,71 ± 11,47 B C		27,27 ± 7,21 C D E
TLT 48 horas	27,24 ± 12,69 C D E	41,51 ± 9,15 A B	18,10 ± 6,00 E
TLT 96 horas	33,75 ± 8,62 B C D	46,58 ± 17,02 A	23,12 ± 7,46 D E
TTT 24 horas	25,84 ± 4,75 C D E		26,71 ± 8,23 C
TTT 48 horas	27,44 ± 7,20 C D E	42,45 ± 5,08 A B	31,18 ± 7,34 B C D
TTT 96 horas	26,02 ± 7 C D E	48,36 ± 12,97 A	29,40 ± 9,10 C D

Área marcada da fibronectina por IHQ. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey. $p \leq 0,05$. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.5.3 Fibronectina - Densidade Óptica

A densidade óptica (DO) da fibronectina (Figura 23, Tabela 7) foi significativamente mais elevada no cabo da TTT 48, sendo superior ao nervo controle, e ao seu coto fibular proximal e fibular distal. A DR da fibronectina foi em geral menor no coto fibular distal do que no nervo fibular proximal, ou no nervo tibial, mas as diferenças não foram significativas.

Figura 23. Densidade óptica da fibronectina por IHQ. Dados apresentados como média mais desvio padrão. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. * diferença significativa em relação ao controle. = Representa que não foi observada diferença significativa em relação ao controle, pelo teste de Anova com post hoc de Tukey. $p \leq 0,05$.

Tabela 7. Densidade óptica da fibronectina

	Tibial/Fibular proximal	Cabo	Fibular distal
Nervo controle	100,53 ± 12,38 B C		
TLT 24 horas	102,85 ± 22,51 B		76,41 ± 12,13 D E
TLT 48 horas	72,62 ± 9,93 C D E	93,12 ± 9,36 B C D	57,09 ± 7,24 E
TLT 96 horas	95,5 ± 11,45 B C D	98,33 ± 12,10 B C	84,27 ± 11,04 B C D
TTT 24 horas	77,44 ± 13,58 B C D		88,36 ± 28,21 C D E
TTT 48 horas	87,49 ± 12,15 B C D	126,85 ± 42,73 A	73,76 ± 14,35 D E
TTT 96 horas	75,54 ± 9,62 D E	92,36 ± 9,84 B C D	87,55 ± 30,86 B C D

Densidade Óptica da fibronectina por IHQ. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey. $p \leq 0,05$. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.6.1 Laminina - Western Blot

O valor da DR da laminina (Figura 21, Tabela 8) expressada no fluido condicionado (Figura 24) foi 138% (TLT 96 horas) e 108,9% (TTT 96 horas) do nervo fibular controle. O fluido condicionado apresentou DR com valores similares aos encontrados no nervo fibular com 104,5% na TLT 48 horas e 114,9% e na TTT 48 horas. A quantidade de laminina expressado no cabo foi de 87% (TLT 48 horas) e 71,7% (TTT 48 horas). Foi observado aumento na expressão da lamina na TLT 96 no cabo - 265,2%, enquanto que no fluido condicionado foi observado queda na DR para 97,2% do valor referencial.

Figura 24. Densidade relativa da laminina por Western Blot. O nervo fibular controle foi utilizado como referencial para normalizar os valores dos grupos experimentais. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

Tabela 8. Densidade relativa da laminina

	Cabo	Fluido Condicionado
TLT24		1,38
TLT48	0,87	1,045
TLT96	2,652	0,972
TTT24		1,089
TTT48	0,717	1,149
TTT96	2,109	2,542

Densidade relativa da fibronectina. O nervo fibular controle foi utilizado como referencial para normalizar os valores dos grupos experimentais. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.6.2 Laminina - Fração da área

Foi observada diminuição considerável na distribuição da laminina nos grupos experimentais quando comparados com o grupo controle. Apenas o cabo de regeneração e o nervo fibular proximal dos grupos TTT 48 e TTT 96 horas se aproximaram dos valores encontrados no nervo não operado. Ocorreu leve diminuição na distribuição da laminina nos cotos distais, embora isto não tenha sido estatisticamente significativo (Figura 25, Tabela 9).

Figura 25. Área marcada pela laminina por IHQ. Dados apresentados como média mais desvio padrão. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. = não foi observada diferença significativa em relação ao controle. Grupos sem marcação tem área significativamente menor do que a do grupo controle pelo teste de Anova com post hoc de Tukey. $p \leq 0,05$.

Tabela 9. Fração da área da laminina

	Tibial/Fibular proximal	Cabo	Fibular distal
Nervo controle	54,3 ± 13,5 A		
TLT 24 horas	32,9 ± 12,8 B C D E F		30 ± 5,4 D E F G
TLT 48 horas	25,66 ± 12,68 F G	30,82 ± 12,50 E F G	31,92 ± 5,88 B C D E F G
TLT 96 horas	25,70 ± 6,73 F G	41,11 ± 7,26 B	20,43 ± 8,91 G
TTT 24 horas	29,96 ± 7,14 F G		26,04 ± 11,34 C D E F G
TTT 48 horas	42,6 ± 8,65 A B	41,24 ± 8,21 A B C D E	39,13 ± 2,80 B C D E
TTT 96 horas	30,91 ± 2,82	44,03 ± 8,81 A B	35,39 ± 3,27 B C D E F

Área marcada da laminina por IHQ. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey $p \leq 0,05$. Dados apresentados como média mais desvio padrão. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.6.3 Laminina - Densidade óptica

A DO da laminina manteve-se estável durante os períodos experimentais, próxima dos valores encontrados no nervo controle, com a exceções do período do coto fibular proximal na TTT 96 horas, que foi marcadamente mais elevado do que os outros tempos experimentais (Figura 26, Tabela 10).

Figura 26. Densidade óptica da laminina por IHQ. Dados apresentados como média mais desvio padrão. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. = não foi observada diferença significativa em relação ao controle. Grupos sem marcação tem densidade óptica significativamente menor do que a do grupo controle pelo teste de Anova com post hoc de Tukey. $p \leq 0,05$.

Tabela 10. Densidade óptica da laminina

	Tibial/Fibular proximal	Cabo	Fibular distal
Nervo controle	115,8 ± 4,76 A		
TLT 24 horas	91,7 ± 8,72 B C		78,15 ± 6,84 B C D
TLT 48 horas	76,18 ± 14,33 B C	67,45 ± 15,62 D E	82,63 ± 3,78 B C
TLT 96 horas	91,66 ± 24,8 A	105 ± 37,30 A B	102,31 ± 54,5 A B C
TTT 24 horas	85,84 ± 9,6 B C		78,84 ± 16,94 B C
TTT 48 horas	103,40 ± 8,37 A B C	74,41 ± 18,79 B C D	93,55 ± 5,89 B C
TTT 96 horas	160,41 ± 61,24 A	74,9 ± 7,53 C D	88,91 ± 4,62 D

Densidade Óptica da fibronectina por IHQ. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey. Dados apresentados como média mais desvio. $p \leq 0,05$. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. * diferença significativa em relação ao controle. = não foi observada diferença significativa em relação ao controle. Grupos sem marcação não apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

4.7.1 VEGF - Western Blot

A expressão do VEGF no fluido condicionado aproximou-se do nervo fibular controle, tanto na TLT 24 horas (95,6%) quanto na TTT 24 horas (102,2%). A expressão no fluido condicionado decaiu levemente em ambos os grupos para 81,5% na TLT 48 horas e 93,3% na TTT 48 horas. No cabo de regeneração, o valor da DR foi de 81,5% na TLT 48 e na 96,8% na TTT 48 horas. A quantidade de VEGF expressado no cabo de regeneração manteve-se estável nos dois grupos com TLT 96 horas - 90,5% e TTT 96 horas - 105,9%. Ambos os grupos apresentaram aumento na expressão do fluido condicionado, com TLT - 99,1% e TTT - 125,4% (Figura 27, Tabela 11).

Figura 27. Densidade relativa do VEGF por Western Blot. O nervo fibular controle foi utilizado como referencial para normalizar os valores dos grupos experimentais. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

Tabela 11. Densidade relativa do VEGF

	Cabo	Fluido Condicionado
TLT 24		0,956
TLT 48	0,895	0,815
TLT 96	0,905	0,991
TTT 24		1,022
TTT 48	0,933	0,968
TTT 96	1,059	1,254

Densidade relativa do VEGF. O nervo fibular controle foi utilizado como padrão de referencial para normalizar os valores dos grupos experimentais. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.7.2 VEGF - Fração da área

Os cabos de regeneração apresentaram as maiores áreas marcadas pelo VEGF (Figura 28, Tabela 12), seguidos pelos cotos distais. A área marcada no grupo TLT manteve-se estável, enquanto que no grupo TTT foi observado aumento entre 48 e 96 horas.

Figura 28. Fração da área marcada do VEGF por IHQ. Dados apresentados como média mais desvio padrão. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. * diferença significativa em relação ao controle. = não foi observada diferença significativa em relação ao controle. Grupos sem marcação tem densidade óptica significativamente menor do que a do grupo controle pelo teste de Anova com post hoc de Tukey. $p \leq 0,05$.

Tabela 12. Fração da área do VEGF

	Tibial/Fibular proximal	Cabo	Fibular distal
Nervo controle	46,81 ± 7,43 C D		
TLT 24 horas	32,04 ± 18,15 E		44,95 ± 14,70 C D
TLT 48 horas	45,67 ± 10,17 C D	51,83 ± 13,96 B C	48,24 ± 7,85 C
TLT 96 horas	34,75 ± 9,51 D E	61,53 ± 13,54 A	47,34 ± 5,88 C D
TTT 24 horas	33,91 ± 8,35 D E		32,1 ± 6,65 E
TTT 48 horas	40,41 ± 4,40 C D E	46,53 ± 7,66 C D	39,08 ± 3,91 C D E
TTT 96 horas	51,77 ± 3,53 B C	70,64 ± 8,81 A	64,46 ± 9,73 A B

Fração da área marcada do VEGF por IHQ. Grupos contendo as mesmas letras indicam que não há diferença significativa entre eles pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey. $p \leq 0,05$. Dados foram apresentados como média mais desvio padrão. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.7.3 VEGF - Densidade Óptica

A DO do VEGF manteve-se estável no grupo TLT após o período de 24 horas, apresentando nível similar ao controle. No grupo TTT, submetido a transecção, ocorreu aumento significativo na DR nos cotos distais, quando comparados com o controle (Figura 26).

Figura 29. Densidade óptica do VEGF por IHQ. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. Dados foram apresentados como média mais desvio padrão. * diferença significativa em relação ao controle. = não foi observada diferença significativa em relação ao controle. Grupos sem marcação tem densidade óptica significativamente menor do que a do grupo controle pelo teste de Anova com post hoc de Tukey. $p \leq 0,05$.

Tabela 13. Densidade óptica do VEGF

	Tibial/Fibular proximal	Cabo	Fibular distal
Nervo controle	100,92 ± 21,64 C D E		
TLT 24 horas	89,50 ± 41,24 E F		129,77 ± 29,03 A B
TLT 48 horas	107,71 ± 14,33 D E F	90,59 ± 12,88 D E F	73,58 ± 9,32 F
TLT 96 horas	80,21 ± 10,6 F	106,95 ± 17,39 A B C	76,25 ± 6,25 F
TTT 24 horas	87,52 ± 11,63 D E F		138,53 ± 30,45 A
TTT 48 horas	131,45 ± 13,57 A B C	104,06 ± 28,37 B C D E F	139,81 ± 18,33 A
TTT 96 horas	119,58 ± 8,36 A B C D	112,20 ± 15,68 A B C D E	134,1 ± 4,32 A B

Densidade óptica do VEGF por IHQ. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey. Dados apresentados como média mais desvio. $p \leq 0,05$. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

Os cabos de regeneração dos grupos experimentais apresentaram fração da área marcada por VEGF e DO elevadas (Figura 30), em especial em relação ao controle (A)

nos períodos TLT 48 horas (B); de TTT 48 horas (C); TLT 96 horas e TTT 96 horas. O nervo fibular distal do grupo TTT 96 horas (F) também apresentou maior intensidade de marcação do que o grupo TLT 96 horas(G).

Figura 27. IHQ do grupo VEGF - (A) Nervo controle; (B) Cabo TLT 48 horas; (C) Cabo TTT 48 horas; (D) Cabo TLT 96 horas; (E) Cabo TTT 96 horas; (F) Nervo Fibular distal - TTT 96 horas; (G) Nervo Fibular distal. Corados com DAB e hematoxilina. Aumento de 320 vezes.

4.8.1 S100B - Western Blot

O fluido condicionado dos grupos TLT 24 horas e TTT 24 horas apresentou valores bastante próximos aos do nervo fibular, com DR de 105,2% e 103,9%. Na TLT 48 horas, a expressão do S100B representou 82,1% do valor encontrado no nervo fibular, enquanto o valor expresso na TTT foi de 73,3%. O fluido condicionado apresentou valores similares aos encontrados durante as 24 horas com 93,1 % na TLT 48 horas e 100,6% na TTT 48 horas. Na TLT 96 horas, a DR no cabo foi de 87,3% e no fluido condicionado 100,5%. Na TTT 96 horas, foi observada diminuição na expressão do S100B no fluido condicionado (75,8%) (Figura 28, Tabela 14).

Figura 28. Densidade relativa do S100B por Western Blot. O nervo fibular controle foi utilizado como referencial para normalizar os valores dos grupos experimentais. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

Tabela 14. Densidade relativa do S100B

	Cabo	Fluido Condicionado
TLT 24		1,05
TLT 48	0,82	0,93
TLT 96	0,87	1,01
TTT 24		1,04
TTT 48	0,73	1,01
TTT 96	0,82	0,76

Valores da Densidade Relativa do S100B. O nervo fibular controle foi utilizado como referência. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.8.2 S100B - Fração da área

Os cabos de regeneração dos grupos apresentaram uma área marcada significativamente maior do que a encontrada no grupo controle e nos seus respectivos cotos tibial/fibular proximal e fibular distal dos outros grupos (Figura 29, Tabela 15). A única exceção foi o nervo tibial do grupo TLT 48 horas, que não apresentou diferença significativa quando comparado com esses grupos. Também foi observado aumento significativo na área marcada nos nervos tibial na TLT 24 e na TLT 48 horas e no coto fibular proximal tanto na TTT 24 horas quanto na TTT 48 horas. Em geral o coto fibular distal apresentou menor área marcada, mas esta diferença só foi estatisticamente significativa no grupo TTT 48 horas.

Figura 29. Fração da área marcada pela IHQ do S100B. Dados apresentados como média mais desvio padrão. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. * diferença significativa em relação ao controle. = não foi observada diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 15. Fração da área do S100B

	Tibial/Fibular proximal	Cabo	Fibular distal
Nervo controle	24,6 ± 8,2 F G		
TLT 24 horas	38,48 ± 6,72 C D		36,15 ± 8,13 C D E
TLT 48 horas	42,97 ± 9 B C	48,9 ± 9 A B	33,66 ± 4,27 C D E F G
TLT 96 horas	23,8 ± 11,23 G	54,7 ± 4,08 A	28,12 ± 5,54 D E F G
TTT 24 horas	35,8 ± 6,68 D E F		33,05 ± 16,49 C D E
TTT 48 horas	37,00 ± 2,77 C D E	49,38 ± 8,26 A B	26,78 ± 9,37 E F G
TTT 96 horas	32,16 ± 8,44 D E F G	49,33 ± 7,15 A B	30,10 ± 5,79 D E F G

Área marcada pela IHQ do S100. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey. Dados apresentados como média mais desvio. $p \leq 0,05$. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.8.3 S100B - Densidade óptica

A intensidade da marcação, indicada pela DO foi mais elevada no segmento do nervo tibial dos grupos submetidos a TLT (Figura 33, Tabela 16), em especial quando comparados com o coto fibular proximal na TTT. Os cabos de regeneração e o coto fibular distal apresentaram em geral marcação mais fraca do que a encontrada no nervo tibial, mas não foi observada diferença significativa entre os de regeneração do coto fibular proximal dos grupos TTT, os cabos de regeneração ou os cotos do nervo fibular distal. Em nenhum dos grupos experimentais, a DO se aproximou do valor encontrado no nervo controle.

Figura 33. Densidade óptica do S100B por IHQ. Dados apresentados como média mais desvio padrão. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. * significativa em relação ao controle. = não foi observada diferença significativa em relação ao controle Ausência de marcação indica .

Tabela 16. Densidade óptica do S100B

	Tibial/Fibular proximal	Cabo	Fibular distal
Nervo controle	204,16 ± 9,62 A		
TLT 24 horas	123,83 ± 21,09 B C		82,86 ± 11,51 E F
TLT 48 horas	158,13 ± 10,92 B C	87,94 ± 9,22 D E F	108,51 ± 6,2 B D
TLT 96 horas	112,44 ± 45,40 B C	83,4 ± 14,16 E F	85,6 ± 13,87 D E F
TTT 24 horas	96,2 ± 9,49 C D E		79,46 ± 11,61 E F
TTT 48 horas	88,31 ± 5,09 D E F	90,85 ± 17,01 D E F	77,63 ± 12,21 E F
TTT 96 horas	74,61 ± 9,94 D E F	92,67 ± 16,57 D E F	73,07 ± 30,08 D E F

Densidade óptica do S100B por IHQ. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey. $p \leq 0,05$. Dados apresentados como média mais desvio.. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.9.1 GFAP - Western Blot

A quantidade de GFAP expressado no fluído condicionado foi de 116,5% na TLT 24 horas, enquanto na TTT 24 horas o valor foi de 93,3% do valor do nervo normal (Figura 34, Tabela 17). No cabo de regeneração os valores foram 45,1% (TLT 48) e 54,5% (TTT 48 horas) do valor encontrado no nervo fibular normal. Ocorreu diminuição da densidade óptica do GFAP no fluído condicionado comparado com o período de 24 horas, tanto na TLT 48 horas (68,1%), quanto na TTT 48 horas (41,7%). no fluído condicionado do TTT 96 horas (103,8%), quando comparado com as outras datas. A única exceção foi na expressão do GFAP no fluído condicionado na TLT 96 horas (90,8%), que foi inferior a encontrada na TLT 24 horas (116,5%).

Figura 34. Densidade relativa do GFAP por Western Blot. O nervo fibular controle foi utilizado como valor referencial para normalizar os valores dos grupos experimentais. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

Tabela 17. Densidade Relativa do GFAP

	Cabo	Fluído Condicionado
TLT 24		1,16
TLT 48	0,45	0,68
TLT 96	0,82	0,91
TTT 24		0,93
TTT 48	0,55	0,42
TTT 96	0,79	1,04

Densidade relativa da GFAP medida por Western Blot. O nervo fibular não operado foi utilizado como valor referencial para normalizar os valores dos grupos grupos. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.9.2 GFAP - Densidade óptica

A DO do GFAP no nervo tibial doador manteve-se estável durante as 96 horas, enquanto que foi observado aumento no DO do coto fibular distal de ambos os grupos; Também foi observado aumento na DO do GFAP no nervo fibular proximal (figura 35, tabela 18).

Figura 35. Densidade óptica do GFAP por IHQ. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey, $p \leq 0,05$. Dados apresentados como média mais desvio. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. * diferença significativa em relação ao controle. = não foi observada diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 18. Densidade óptica do GFAP

	Tibial/Fibular proximal	Cabo	Fibular distal
Nervo controle	58,91 ± 7,90 E D F		
TLT 24 horas	67,26 ± 18,56 E D		62,90 ± 14,64 E D
TLT 48 horas	59,3 ± 9,13 E	56,29 ± 6,19 D E	87,41 ± 8,43 B C
TLT 96 horas	77,1 ± 14,37 C D E	105,12 ± 8,50 B C	120,44 ± 21,76 A B
TTT 24 horas	73,68 ± 18,56 B C D		66,09 ± 12,35 E D F
TTT 48 horas	83,39 ± 9,3 B C	67,22 ± 8,74 E	107,55 ± 39,75 A B C D
TTT 96 horas	105,33 ± 24,0 A B	100,93 ± 29,70 A	107,8 ± 7,01 A

Densidade Óptica do GFAP. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey. Dados apresentados como média mais desvio. $p \leq 0,05$. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.10.1 GAP 43 - Western Blot

A DR do fluído na TLT 24 horas foi de 85,7% do valor encontrado no nervo fibular, enquanto na TTT 24, o valor foi de 75%. Tanto o fluído condicionado dos grupos TLT 48 horas (60,9%) quanto da TTT 48 horas (65,2%) apresentaram diminuição na expressão do GAP43 quando comparados com o período de 24 horas. O cabo de ambos os grupos apresentou DR elevada (TLT 48 horas - 132,6%) (TTT 48 horas - 124,4%) com expressão acima da encontrada no nervo fibular normal (Figura 36, Tabela 19). No grupo TLT 96 horas ocorreu diminuição na expressão do GAP43 no fluído condicionado 58,3% quando comparados com os valores encontrados no grupo TLT 48 horas.

Figura 36. Densidade relativa do GAP43 por Western Blot. O nervo fibular controle foi utilizado como referencial para normalizar os valores dos grupos experimentais. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

Tabela 19. Densidade Relativa do GAP43

	Cabo	Fluído Condicionado
TLT 24		0,86
TLT 48	1,33	0,61
TLT 96	1,76	0,58
TTT 24		0,75
TTT 48	1,24	0,65
TTT 96	1,71	0,94

Densidade relativa do GAP43 por Western Blot. O nervo fibular controle foi utilizado como referencial para normalizar os valores dos grupos experimentais. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

4.10.2 GAP43 - Densidade óptica

Ocorreu aumento na DO do GAP43 no nervo tibial doador, que continuou elevado até o período de 96 horas. A expressão do GAP43 também manteve-se elevada no coto fibular proximal nas primeiras 48 horas, mas recedeu para níveis iguais ao controle (figura 37, Figura 38, tabela 20).

Figura 37. Densidade Óptica do GAP 43 por IHQ. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey. Dados apresentados como média mais desvio. $p \leq 0,05$. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal. * diferença significativa em relação ao controle. = não foi observada diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 20. Densidade óptica do GAP43

	Tibial/Fibular proximal	Cabo	Fibular distal
Nervo controle	65,45 ± 21,69 F G		
TLT 24 horas	114,75 ± 18,21 B C D		131,06 ± 16,54 A B
TLT 48 horas	122,61 ± 11,61 A B C	111,12 ± 6,32 C D E	115,68 ± 3,42 B C D
TLT 96 horas	95,5 ± 11,45 C D E	98,35 ± 12,10 A B	84,27 ± 11,05 A B C D F
TTT 24 horas	159,7 ± 18,85 A		93,07 ± 6,73 C D E
TTT 48 horas	135,32 ± 19,66 A B C	106,15 ± 12,09 D E	87,33 ± 21,58 C D E F
TTT 96 horas	65,77 ± 5,57 G	100,31 ± 14,10 D E	105,94 ± 7,45 C D E

Densidade Óptica do GAP43 por IHQ. Grupos com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Anova com post hoc de Tukey. Dados apresentados como média mais desvio. $p \leq 0,05$. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

Figura 38. Membrana de PVDF, gel SDS-PAGE 10%, Diluição 1:1000 em TBS-T. Presença de GAP43 no cabo de regeneração e fluído condicionado analisado por imunodeteção. TLT - Tubulização látero-terminal. TTT - Tubulização término-terminal.

5 .DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A técnica de tubulização término terminal ainda está em evolução, e ultimamente, relatos da sua superioridade em relação à sutura direta na prática clínica tem sido descritos (LOHMEYER ET AL, 2009). Mesmo sem a utilização de fatores neurotrófico no interior do tubo, ela atenua ou resolve alguns dos problemas inerentes da sutura direta, removendo ou diminuindo a tensão presente entre as duas extremidades do nervo, além de impedir a entrada de tecido cicatricial entre os cotos suturados (NGEOW, 2010). Além disso, outro problema identificado com a utilização da sutura direta, seria a possibilidade de os cotos poderiam ser conectados de maneira desalinhada, prejudicando o desenvolvimento das fibras, enquanto que na tubulização, o interior do tubo proporciona espaço para o crescimento de fibras de maneira alinhada e mais natural. (LUNDBORG et al, 2004, ZHANG et al, 2015).

Comparada com a TTT, o número de estudos ao redor da TLT sem janela epineural e dos mecanismos de brotamentos colaterais é consideravelmente menor. Durante as últimas décadas, a TTT foi incorporada na prática cirúrgica com sucesso. O foco deste estudo foi descrever as alterações histológicas encontradas ao longo do tempo no modelo de tubulização látero-terminal sem a criação de janela epineural no nervo doador (TLT), além de observar e comparar diferenças na expressão de proteínas entre a TLT e a tubulização término-terminal (TTT). Para este fim foram escolhidas proteínas da MEC, a fibronectina e a laminina; VEGF, um marcador de neovascularização, marcadores de células de Schwann (S100B e GFAP), e o GAP43, uma proteína que interage com o citoesqueleto axonal, induzindo e direcionando crescimento e a expansão dos axônios. Estas proteínas são importantes no processo de desenvolvimento e manutenção da homeostase do nervo sadio, além de serem naturalmente super expressadas em resposta a lesões no SNP, sendo consideradas essenciais para a regeneração adequada do nervo. Deleções ou mutações nos genes responsáveis pela síntese da laminina (YU et al, 2005) ou VEGF (OOSTHUYSE et al, 2001), resultam na morte de células de Schwann ou na degeneração de axônios motores.

5.1 Eventos sequencias na tubulização látero-terminal

A primeira etapa da regeneração seguindo a tubulização, é marcada pelo acúmulo de fluido condicionado no interior do tubo, contendo fatores neurotróficos (LONGO et al, 1983A; LONGO et al, 1984; DANIELSEN, VARON, 1995; YE, LI, LI, 2014). Também estão presentes proteínas do sistema complemento, que fazem parte da resposta imune inata e são liberados quando ocorre morte celular (LI et al, 2016) e proteínas da MEC, e de especial interesse, a fibronectina e a laminina em forma solúvel (LONGO et al, 1984; LE BEAU et al, 1988; LIU, 1992). Juntamente com a secreção de fluido, foi observado o acúmulo de uma malha de proteínas fibrosas na extremidade do coto fibular proximal e na lateral do nervo tibial doador nas primeiras 24 horas. Adicionalmente, observamos pela primeira vez no contexto da TLT, a presença do VEGF, S100B, GAP 43 e por fim o GFAP, indicando a presença de células de Schwann no fluido condicionado.

A partir do segundo dia de tubulização, a MEC depositada foi densa o suficiente para permitir a formação de um cabo de regeneração sólido no interior dos tubos de silicone; em todos os animais submetidos a TLT, e em três dos cinco animais submetidos a microscopia óptica no grupo TTT. A taxa de formação dos cabos de regeneração, e consequentemente a neovascularização e o crescimento de fibras nervosas no interior do tubo está diretamente relacionado com o tamanho da lacuna entre os cotos. Em modelos experimentais com lacunas pequenas de 2 mm, é observada a formação de um cabo de regeneração vascularizado em apenas dois dias (ZHANG et al, 2017). Da mesma maneira, nos modelos de TTT com lacuna entre 10 e 15 mm, apenas 40% dos animais desenvolvem cabo, consistentemente mais fino do que nos animais com lacuna menor (LOHMEYER et al, 2009). A matriz de fibrina que formou-se no interior do tubo foi marcadamente mais densa proximalmente ao nervo tibial e ao nervo fibular proximal, indicando que ela é sintetizada principalmente pelas células oriundas do coto fibular proximal e do nervo tibial doador.

Embora neste estudo tenha sido analisado apenas a expressão da laminina e da fibronectina no fluido condicionado, sabe-se outros componentes da MEC, como os colágenos tipo I, III e IV; versicano e o nidogênio (SVIZENSKA, DUBVOY, STASTNA, 2001; BYRAN et al, 2012) também estão presentes no cabo de regeneração, sendo possível supor que eles também estão sendo constantemente sintetizados no fluido e incorporados na MEC. A laminina e a fibronectina

continuaram o seu padrão de expressão no cabo de regeneração e no fluido condicionado no período de 96 horas.

O nível de S100B e de VEGF encontrados no fluido condicionado mantiveram-se estáveis durante o período do experimentos. A distribuição do S100B no cabo de regeneração foi significativamente mais ampla do que no nervo sadio, embora sua DO tenha sido significativamente inferior, indicando que o S100B encontrado no cabo de regeneração está difundido em uma grande área, mas em pequenas quantidades no meio extracelular, ao invés de concentrado no interior das células de Schwann. O VEGF também foi altamente expressado no cabo de regeneração e especialmente no coto distal da TTT. Ambas as proteínas são liberados no meio extracelular em resposta à lesões, e tem sua síntese induzida em resposta à grandes demandas metabólicas, como é o caso de processo de regeneração. Para determinar com certeza quais células estão sintetizando o S100B e o VEGF e qual a sua distribuição no meio extracelular, seria necessário a utilização de uma técnica mais precisa como a citometria de fluxo, que não foi o foco deste estudo.

O GFAP, outro marcador de células de Schwann, superexpressado nas células de Schwann em divisão, também apresentou aumento na expressão nos animais submetidos a TTT. As diferenças encontradas na DR do GFAP e do S100B entre os dois modelos cirúrgicos, indicam que não foram causadas lesões no nervo tibial doador, ou que elas foram muito menos extensas quando comparadas com as do nervo fibular proximal. Estas observações indicam que os nervo tubulizados, tanto na TLT, quanto na TTT ainda encontra-se na fase inicial de síntese da MEC e da proliferação e migração celular para o interior do cabo de regeneração.

5.2 Matriz Extracelular

A síntese e polimerização das proteínas da MEC consisti na primeira fase do processo de reparo celular, e serve como base para os processos posteriores de angiogênese, proliferação e migração celular necessárias para a regeneração axonal. A MEC é composta principalmente por colágenos formadores de fibrila, em especial os colágenos tipo I e III, que ocupam aproximadamente entre 20% e 30 % do espaço extracelular, atuando como componente que dá sustentação mecânica ao tecido, substrato para a ancoragem de outras proteínas da MEC (MOUW, WEAVER, 2014). A laminina e a fibronectina são proteínas da lâmina basal, a região da MEC em

contato direto com a membrana celular, sendo que no nervo intacto elas apresentam baixa expressão. Apenas quando a homeostase do tecido é alterada, seja devido a lesões, ou condições patológicas, que elas retornam a serem expressada acima da sua concentração basal.

A fibronectina foi a proteína com a maior expressão no fluido condicionado, quando comparada com a DR do nervo controle. Ela é encontrada em duas formas no organismo, a fibronectina plasmática e fibronectina celular. Pequenas quantidades de fibronectina plasmática estão presentes na circulação, e juntamente com a fibrina, é um dos componentes da matriz de tecido fibroso provisória que forma-se rapidamente após a lesão, sendo eventualmente substituída pela fibronectina celular (JOSEPHINE et al, 2013).

A fibronectina celular é secretada em forma solúvel e compacta, com apenas o seu módulo III exposto, necessitando da interação com as integrinas da membrana celular para que seus módulos I e II sejam expostos, permitindo a sua interação com outras moléculas da MEC e inicializando o processo de polimerização (MAO, SCHWARZBAUER, 2005; YONG, JEAN, 2005; TO, MIDWOOD, 2011). Ela é secretada por macrófagos, fibroblastos e hemácias (BROWN et al, 1993; STOFFELS, ZHAO, BARON, 2013). Neutrófilos também apresentam a capacidade de sintetizar fibronectina enquanto se encontram na corrente sanguínea, e ao invadir o local da lesão, secretam as suas reservas de fibronectina intracelular durante as primeiras 24 horas (DOYU et al, 1993). Esta pode ser uma das causas na diminuição da quantidade de fibronectina encontrada no fluido no período de 48 horas. Neutrófilos foram encontrados em grande quantidade no cabo, e no período de 48 horas, teriam depletado as suas reservas de fibronectina. A diminuição na quantidade de fibronectina no fluido no período de também poderia ser explicada pela polimerização e deposição da fibronectina solúvel acumulada no fluido condicionado.

Da mesma maneira, foi observada a presença de laminina no cabo e no fluido condicionado, com padrão similar de expressão. A área e a DO da laminina não foram tão expressivas quando comparadas com os valores da fibronectina. A laminina também é secretada em forma solúvel, embora seja sintetizada por um número menor de tipos celulares, entre elas células de Schwann. Assim como a fibronectina, ela não forma polímeros estáveis com outras lamininas quando se encontra solubilizada no fluido condicionado. Quando em contato com as integrinas, as lamininas alinham-se em um plano bidimensional, e iniciam o processo de polimerização (HOHENESTER,

YURCHENCO, 2013). A síntese e a deposição da laminina teria ocorrido em conjunção com a migração de células no lúmen do tubo, que dependem da formação da matriz de fibrina e fibronectina inicial.

A interação com as integrinas não afetam apenas as outras proteínas da MEC. A ativação da integrina $\beta 1$, pelo contato com a laminina, é essencial para o processo de mielinização das células de Schwann em meio de cultura, ocorrendo mesmo na ausência de outras proteínas da MEC, enquanto que o seu bloqueio impede a mielinização (PODRATZ, RODRIGUEZ, WINDRBANK, 2001). Da mesma maneira, a interação da fibronectina com a integrina 5, induz a proliferação e a migração das células de Schwann (EVERCOOREN ET AL, 1982).

5.3 VEGF

O sistema nervoso periférico e o sistema vascular apresentam paralelismos anatómicos e estruturais interessantes. Ambos, a grosso modo, formam uma complexa rede de prolongamentos altamente ramificados; com alto grau de sobreposição entre elas e distribuição em todo organismo a partir de um órgão central, o que exige que estes tecidos possuam a capacidade de atingir seus órgãos alvos distantes. Essa associação pode ser vista durante o período embrionário, onde é observada grande sobreposição entre o sistema vascular e o sistema nervoso. Ambas utilizam vários dos mesmos sinais tróficos para guiarem-se e atingirem seus órgãos alvo (CARMELIET, TESSIER-LAVIGNE, 2005; MACKENZIE, RUHRBERG, 2012). Isto se traduz na existência de fatores que apresentam tanto potencial neurotrófico, quanto angiogênico, como é o fato do NGF e o próprio VEGF (LAZAROVIC, MARCINKIEWICZ, LELKES, 2006).

Utilizamos anticorpos contra o VEGFA, uma das proteínas que atua tanto no sistema nervoso, quanto no sistema vascular, sendo um potente indutor de neovascularização, além da proliferação e multiplicação de células neuronais (LAZAROVIC, MARCINKIEWICZ, LELKES, 2006). Ele promove a sobrevivência celular principalmente inibindo a ativação da caspase-3, indutora de apoptose (SUN, GUO, 2005). Ele também atua impedindo o colapso do cone de crescimento dos nervos simpáticos, de maneira similar a sua atuação na ponta endotelial dos vasos sanguíneos, mesmo na presença da semaforina SemaA3, que atua como indutor negativo do crescimento axonal (MARKO, DAMON, 2008). Além de promover a

sobrevivência das células de Schwann e a estabilidade dos axônios, o VEGF atua diretamente no processo de neovascularização dos nervos lesionados. O VEGF mobiliza células endoteliais para o local da lesão. Ao se ligar as proteínas da ponta endotelial, ele causa a estabilização do filipódio e consequentemente, aumentando a sua área de contato com a MEC, guiando o crescimento dos vasos (WANG et al, 2008; CAILLAUD et al, 2019). As células endoteliais que penetram no local da lesão interagem inicialmente com a fibronectina, sendo que a sua ligação com o receptor de integrina $\alpha 5$ induz a migração, proliferação e adesão das células epiteliais. Já a interação com a laminina induz a diferenciação das células para um fenótipo amadurecido (SOTTILE, 2004).

Observamos diferença significativa na expressão do VEGF entre a TLT e a TTT, significativamente maior no segundo grupo, especialmente no coto distal. A transecção do nervo fibular proximal, permitiu o acesso do ambiente da regeneração às células inflamatórias e hemácias, ambos tipos celulares capazes de sintetizar VEGF. Além de ter induzido um ambiente hipoxico no interior do tubo. Lesões no nervo estão associadas com aumento na produção de VEGF. Mesmo animais submetidos a esmagamento do nervo, sem perda de continuidade apresentam aumento na expressão do VEGF, que inicia-se seis horas após a lesão e continua elevada durante ao menos 96 horas (TANG et al, 2009). O nervo tibial apresentou expressão do VEGF, tanto em área marcada quanto na DO, bastante similar ao nervo controle, enquanto que foi observado aumento na sua expressão no cabo de regeneração e no coto fibular distal, ambos ambientes isquêmicos.

O crescimento de novos vasos sanguíneos é essencial para a regeneração do nervo, e precede a migração das células de Schwann na MEC (HOBSON et al, 1997). Assim como no desenvolvimento embrionário, a inervação imita a vascularização, com os axônios crescendo paralelamente com o vasos sanguíneos (BAUTCH, 2012; CARMELIET, TESSIER-LAVIGNE, 2005). A velocidade com que os vasos penetram o cabo de regeneração dependem do modelo cirúrgico, da composição do tubo e do tamanho da lacuna, mas parece ter início entre o terceiro e o quarto dia após a produção de uma matriz sólida para atuar como substrato de suporte. Eventualmente os vasos sanguíneos percorrem a extensão do tubo após sete dias (HOBSON et al, 1997; CATTIN et al 2015). Estes vasos são essenciais para a regeneração do nervo, e servem como guias de migração para as células de Schwann, sendo observada a sua associação através da coloração com S100 e VEGF (HOBSON et al, 1997). No

período de 96 horas, ainda não foi observado o crescimento de vasos sanguíneos dentro do cabo de regeneração, tanto na TTT 96 quanto na TLT.

5.4 Células de Schwann - S100B e GFAP

O GFAP é uma proteína do citoesqueleto das células da glia. No SNP ela é sintetizada apenas nas células de Schwann não mielinizantes (YANG, WANG, 2015). A sua expressão diminui consideravelmente algumas semanas após o nascimento, porém as células de Schwann mantêm a capacidade de sintetizar GFAP em resposta a lesões (WOFCHUCK, RODNIGHT, 1995).

Foi observado este aumento tão prontamente quanto nas primeiras 24 horas após a transecção do nervo, sendo visto em todos os grupos submetidos a TTT. Os animais com nervo seccionado que apresentaram uma maior expressão do GFAP, quando comparados com os cotos distais dos nervos submetidos à TLT, nos mesmos intervalos de tempo. Isto poderia ser mais um indicativo de que o modelo de TLT não causou danos condizentes com a transecção de fibras no nervo tibial, portanto não induzindo uma resposta de regeneração tão forte quanto a encontrada na TTT.

Células de Schwann desdiferenciadas têm alta mobilidade, migrando de ambos os cotos do nervo após a TTT. Ela são capazes de migrar 2 milímetros no interior de tubos feitos com enxerto descelularizado nas primeiras 24 horas, tanto do coto proximal quanto do coto distal (HAYASHI et al, 2008). A capacidade de migração do nervo intacto para um tubo suturado lateralmente, é muito menor. Quando Yoshizawa e colaboradores (2016), descreveram um modelo de tubulização lateral sem janela epineural, onde uma das extremidades do tubo era aberta, e suturada ao redor do nervo, a distância migrada pelas células de Schwann foi de menos de 2 mm na primeira semana. Mesmo nos outros grupos experimentais, com a criação de uma janela epi-perineural, só foi observada diferença significativa na distância migrada entre os grupos após duas semanas. Podemos supor que este é o período mínimo para permitir a migração das células de Schwann do nervo doador, para o interior do tubo.

Não observamos diferença significativa na expressão do GFAP na TLT e na TTT, tanto entre os cabos de regeneração, quanto entre os cotos do nervo fibular distal nos mesmos tempos experimentais. A expressão do GFAP foi mais baixa no nervo tibial, indicando menor número de células de Schwann. Com o que conhecemos da capacidade das células de migrarem pelo nervo doador intacto, o coto fibular distal é a

provável origem das células de Schwann encontradas no cabo de regeneração e no fluído.

É interessante observar que os aumentos na expressão do GFAP indicam amadurecimento e na multiplicação das células de Schwann, e precedem os aumentos encontrados na expressão do S100, (ZHANG et al, 2015), e portanto o aumento na expressão do S100B no grupo TTT-96 horas estaria ligado com o aumento no GFAP observado no grupo TTT-48 horas. No fluído condicionado na luz do tubo, foi observado uma maior expressão no GFAP nos grupos TLT 24 e TLT-48 horas, quando comparados com os grupos TTT 24 horas e TTT 48 horas.

Também foi observado aumento significativo na área marcada pela IHQ do S100 nos cabos de regeneração, quando comparados com a área do nervo controle. Também ocorreu aumento na área marcada no nervo tibial na TLT 24 e na TLT 96 horas. Porém a DO de todos os grupos experimentais foi inferior a do nervo fibular controle, indicando que em todos os grupos experimentais, estão, de alguma maneira respondendo à lesão distal.

A densitometria das membranas de Western Blot mostrou que a expressão da proteína S100 manteve-se em um nível estável, com valores próximos do encontrado nos grupos experimentais, com exceção do grupo TTT 96 horas. A proteína S100B é considerada um marcador clássico das células de Schwann, presente tanto nas células mielinizantes (MATA, ALESSI, FINK, 1990) quanto nas não mielinizantes, e sendo expressada em quase todos os seus estágios de desenvolvimento, com a única exceção sendo os precursores das células de Schwann (LIU et al, 2015). Na tubulização com lacuna curta (2mm), foi observado que o número de células de Schwann marcadas positivamente com S100, mantiveram-se estáveis nas primeiras 72 horas pós lesão, e diminuindo lentamente a expressão após este período (ZHANG et al, 2015). Outro grupo, observou que a expressão de S100B se manteve estável em ambos os cotos do nervo isquiático durante a primeira semana pós transecção (CHEN et al, 2008). Deve-se lembrar que o S100B não é apenas um marcador de células de Schwann, e que ele também tem atuação como um sinal extracelular, atuando como regulador na homeostase do cálcio e como sinalizador de lesões teciduais, com a sua superexpressão ocorrendo em resposta a traumas (SEDAGHAT, NOTOPOULOS, 2008).

5.5 GAP-43

Foi observado decaimento na expressão do GAP43 no fluido condicionado. O GAP43 está relacionado com o crescimento e o direcionamento do citoesqueleto axonal, e consequentemente, com a regeneração e a plasticidade do SNP. A sua síntese ocorre principalmente no corpo celular dos axônios, sendo transportada para o cone de crescimento através dos microtúbulos (HOFFMAN, 1989; KORSHUNOVA, MOSEVITSKY, 2010). A presença do GAP43 inclusive pode causar brotamento de fibras aferentes na raiz dorsal contralateral à lesão (CHUNG et al, 1993).

Os nervos tibial e fibular são ramificações do nervo isquiático, então a transecção do nervo fibular proximal também induziria a produção de GAP43 pelos mesmos corpos celulares, e que eventualmente seriam transportados tanto para o nervo fibular, quanto para o nervo tibial intacto. No nosso modelo experimental, observamos que enquanto a DO do GAP43 retornou para níveis próximos do controle no nervo fibular proximal, no nervo tibial ela se manteve consistentemente mais elevada que o controle.

Observações similares foram feitas em experimentos de tubulização lateral com câmara em Y. Neste modelo experimental, o nervo gastrocnêmio medial lesionado foi suturado em um tubo de silicone em Y acoplado ao redor do nervo gastrocnêmio lateral intacto. Entre o 3 e o 7 dia de tubulização foi aumento na reatividade para o GAP43 no nervo doador intacto, mas não no nervo lesionado (YAMAUCHI et al, 2000). A grosso modo o nosso experimento consistiu de um modelo similar, então é possível que o nervo tibial estaria “sequestrando” o GAP43, que normalmente iria para o coto fibular proximal, suturado na pele, em um processo conhecido como “capping”. Porém não encontramos registro na literatura sobre a influência de “capping” no transporte do GAP43 que nos permitisse fazer esta extrapolação.

O GAP43 também é sintetizado pelas células de Schwann imaturas ou em processo de desdiferenciação, quando as células de Schwann retomam a capacidade de sintetizar proteínas normalmente expressadas apenas durante o período embrionário (BASI et al, 1987; PLANTINGA et al, 1993; LIU et al, 2014). O acúmulo de GAP43 no fluido condicionado, com valores expressos superiores aos encontrados nos cotos distais, pode ser uma indicação de que está ocorrendo a desdiferenciação e proliferação das células de Schwann na luz do tubo. Quando comparada a expressão do GAP43 com os outros fatores utilizados como marcadores de células de Schwann, S100B e GFAP, e com os tempos de onde ocorre aumento na

expressão, supõem-se que está ocorrendo na proliferação de células de Schwann, especialmente as não mielinizantes, no interior do tubo.

Outros grupos observaram aumento na expressão do GAP 43 no coto distal após a lesão, mas que nesses casos em específico, foi feita apenas transecção seguida de reparo com sutura direta, uma modalidade de reparo fundamentalmente diferente da tubulização com lacuna (CEBER et al, 2015), ou quando utilizaram TTT, o intervalo mínimo de observação de 7 dias, já é observado a formação de cabo de regeneração sólido unindo os cotos (BYRAN et al, 2012). As observações de Byran e colaboradores são as mais próximas das nossas, pois é possível ver uma tendência ao aumento na expressão do GAP43 no fluído condicionado na TTT-96 horas, quando comparado com a expressão nas outras datas.

Estes resultados indicam que o processo de regeneração do nervo tanto na TLT, quanto na TTT encontram-se na entre a fase inicial de resposta a lesão (FIELDS et al, 1989) e do qual o coto fibular distal seria o principal contribuinte, e a fase de migração e proliferação celular, principalmente de células inflamatórias e hemácias para o interior do tubo, embora nesta etapa a expressão do GFAP e do GAP43 tenha sido observada no cabo e no fluído condicionado, indicando a presença de células de células de Schwann em período de desdiferenciação.

Também foi observado que ao termino do período de 96 horas, não ocorreu diferença na expressão das proteínas do coto fibular distal ou do cabo de regeneração entre os dois modelos cirúrgicos, salvo a expressão do VEGF, e do GAP43 no cabo da TLT 96 horas.

6. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A TTT induziu uma síntese mais rápida de laminina e fibronectina no cabo de regeneração nas primeiras 48 horas, mas esta diferença desapareceu após 96 horas entre os modelos de TTT e TLT.

Foi observado diferença significativa no S100B, VEGF e no GAP43 entre o nervo tibial e o coto fibular proximal, com valores mais próximos do controle observados na TLT.

Com exceção do VEGF, a expressão de todas as proteínas estudadas foi similar no coto fibular distal na TLT e na TTT no período de 96 horas. Isto indica que um estudo mais aprofundado da atuação VEGF seria uma via de pesquisa futura.

Portanto, concluímos que embora não tenha sido causado dano ao nervo doador, a TLT; nos períodos observados, induziu um padrão de síntese de proteínas no lúmen do tubo quase idêntico ao encontrado na TTT.

7.REFERÊNCIAS

ALVARADO S, TAJERIAN M, MILLECAMP S, MATHEW S, STONE LS, MOSHE. Peripheral nerve injury is accompanied by chronic transcriptome-wide changes in the mouse prefrontal cortex. **Molecular Pain**, v 9, n. 4, p. 9-21, Apr 2013.

AUMAILLEY M, BRUCKNER-TUDERMAN L, CARTER WG, DEUTZMANN R, EDGAR D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones, J. C. R. A simplified laminin nomenclature. **Matrix Biology**, v. 24, n. 5, p. 326-332, Aug, 2005.

BABCOCK WW. A standard technique for operations on peripheral nerves with especial reference to the closure of large gaps. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**, v. 45, p. 364-78, 1927.

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

BASI GS, JACOBSON RD, VIRG I, SCHILLING J, SKENE. JHP. Primary Structure and Transcriptional Regulation of GAP-43, a Protein Associated with Nerve Growth. **Cell**, v. 49, p. 785-791, Jun, 1987.

BAUTCH VL. VEGF-directed blood vessel patterning: from cells to organism. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 9, p. 1- 12, Set, 2012.

BELKAS JS, SHOICHET MS, MIDHA R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. **Neurological Research**, v. 26, n. 2, p. 151-60, 2004.

BERG A, ZELANO J, PEKNA M, WILHELMSSON U, PEKNY M, CULLHEIM S. Axonal regeneration after sciatic nerve lesion is delayed but complete in GFAP- and vimentin-deficient mice. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p 1-8, Nov, 2013.

BONTIOTI E, KANJE M, LUNDBORG G, DAHLIN LB. End-to-side nerve repair in the upper extremity of rat. **Journal of the Peripheral Nervous System**. v.10, n. 1, p.58-68; Mar, 2005.

BORISOV AB, HUANG SK, CARLSON BM. Remodeling of the vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. **Anatomical Records**, v. 258, n. 3, p. 292 - 304, Mar, 2000.

BROWN LF, DUBIN D, LAVIGNE L, LOGAN B, DVORAK HF, VAN DE WATER L. Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing. **American Journal of Pathology**, v. 142, n. 3, p. 793–801, Mar, 1993.

BRYAN DJ, LITCHFIELD CR, MANCHIO JV, LOGVINENKO T, HOLWAY AH, AUSTIN J, SUMMERHAYES IC, RIEGER-CHRIST KM. Spatiotemporal expression profiling of proteins in rat sciatic nerve regeneration using reverse phase protein arrays. **Proteome Science**, V. 10, n. 1, p. 1-9, Feb, 2012.

CARMELET P, TESSIER-LAVIGNE M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. **Nature**, v. 436, p. 193-200, Jul 2005.

CARRIEL V, GARZÓN I, CAMPOS A, CORNELISSEN M, ALAMINOS. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. **Journal of Tissue Eng Regen Med**, v. 11, n. 2, p. 553-563, Feb 2017.

CAILLAUD M, RICHARD L, VALLAT JM, DESMOULIÈRE A, BILLET F. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. **Neural Regeneration Research**. V. 14, n. 1, p. 24-33, Jan 2019.

CATTIN AL, BURDEN JJ, VAN EMMENIS L, MACKENZIE FE, HOVING JJ, GARCIA CALAVIA N, GUO Y, MCLAUGHLIN M, ROSENBERG LH, QUEREDA V, JAMECNA D, NAPOLI I, PARRINELLO S, ENVER T, RUHRBERG C, LLOYD AC. Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. **Cell**, v.162, n. 5, p. 1127-39, Aug, 2015.

CEBER M, SENER U, MIHMANLI A, KILIC U, TOPCU B, KARAKAS M. The relationship between changes in the expression of growth associated protein-43 and functional recovery of the injured inferior alveolar nerve following transection without repair in adult rats. **Journal of Craniomaxillofacial Surgery**, v. 43, n. 9, p. 1906-13, Nov 2015.

CHEN YS, WANG-BENNETT LT, COKER NJ. Facial nerve regeneration in the silicone chamber: the influence of nerve growth factor. **Experimental Neurology**, v. 103, n. 1, p. 52-60, Jan 1989.

CHEN ZL, STRICKLAND S. Laminin 1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. **The Journal of Cell Biology**, v. 163, n. 4, p. 889–899, Nov 2003.

CHERNOUSOV MA, YU WM, CHEN ZL, CAREY DJ, STRICKLAND S. Regulation of schwann cell function by the extracellular matrix. **Glia**, v. 56, n. 14, p. 1498–1507, Nov 2008.

DAHLIN LB, ANAGNOSTAKI L, LUNDBORG G. Tissue response to silicone tubes used to repair human median and ulnar nerves. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery** , v. 35, n. 1, p. 29-34, Mar 2001.

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

DANIELSEN N, VARON S. Characterization of neurotrophic activity in the

silicone-chamber model for nerve regeneration. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 11, n. 3, p. 231-5, Mar 1995.

DE MEDINACELI L, PRAYON M, MERLE M. Percentage of nerve injuries in which primary repair can be achieved by end-to-end approximation: review of 2,181 nerve lesions. **Microsurgery**, v. 14, n. 4, p. 244-246, Out 1993.

DENNY JB. Molecular Mechanisms, Biological Actions, and Neuropharmacology of the Growth-Associated Protein GAP-43. **Current Neuropharmacology**, v. 4, n. 4, p. 293-304, Out 2006.

DE-LAS-PEÑAS FC, CLELAND J, PALACIOS-CEÑA M, FUENSALIDA-NOVO S, PAREJA JA, ALONSO-BLANCO C. The Effectiveness of Manual Therapy Versus Surgery on Self-reported Function, Cervical Range of Motion, and Pinch Grip Force in Carpal Tunnel Syndrome: A Randomized Clinical Trial. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 47, n. 3, p.151-161, Mar 2017.

DING T, LU WW, ZHENG Y, LI ZY, PAN HB, LUO Z. Rapid repair of rat sciatic nerve injury using a nanosilver-embedded collagen scaffold coated with laminin and fibronectin. **Regenerative Medicine**, v. 6, n. 4, p.437-447, Jul 2011.

DONATO R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 33, n. 7, p. 637-668, Jul 2001.

DOYU M, SOBUE G, KEN E, KIMATA K, SHINOMURA T, YAMADA Y, MITSUMA T, TAKAHASHI A. Laminin A, B1, and B2 chain gene expression in transected and regenerating nerves: regulation by axonal signals. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 2, p. 543-551, Feb 1993.

DU J, CHEN H, QING L, YANG X, JIA X. Biomimetic neural scaffolds: a crucial step towards optimal peripheral nerve regeneration. **Biomaterial Sciences**, v. 6, n. 6, p. 1299-1311, Maio 2018.

ENG LF. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) the Major Protein of Glial Intermediate Filaments in Differentiated Astrocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 8, n. 4, p. 203-214, Jun 1985.

EVERCOOREN BARON-VAN A, KLEINMAN HK, SEPPÄ HE, RENTIER B, DUBOIS-DALCQ M. Fibronectin promotes rat Schwann cell growth and motility. **Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 1, p. 211-216, Abril 1982.

FIELDS RD, LE BEAU JM, LONGO FM, ELLISMAN MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Progress in Neurobiology**, v. 33, n. 2, p. 87-134, 1989.

GATTA R. Sulla anastomosi latero-terminale dei tronchi nervosa. **Archives Italiennes de Chirurgia** v. 48, p. 155-171, 1938.

GOLDMAN RD, CLELAND MM, MURTHY P, MAHAMMAD S, EDWARD KR. In roads into the Structure and Function of Intermediate Filament Networks. **Journal of structural biology**, v. 177, n. 1, p. 14-23, Jan 2012.

GORA-KUPILAS K, JOSKO J. The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF). **Folia Neuropathologica**, v. 43, n. 1, p. 31-39, 2005.

GRIFFIN JW, HOGAN MV, CHHABRA AB, DEAL DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. **The Journal of Bone and Joint Surgery American volume**, v. 95, n. 23, p. 2144-51, Dec 2013.

GRINSELL D, KEATING CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. **Biomed Research International**, v, 2014, n. 1, p. 1-13, Set 2014.

GUAQUIL VH, PAN Z, KARAGIANNI N, FUKUOKA S, ALEGRE G, ROSENBLATT MI. VEGF-B selectively regenerates injured peripheral neurons and restores sensory and trophic functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 111, n. 48, p. 17272-7, Dec 2014.

GUPTA R., GRAY M., CHAO T., BEAR D., MODAFFERI E., TAHSEEN MOZAFFAR T. Schwann cells upregulate vascular endothelial growth factor secondary to chronic nerve compression injury. **Muscle and Nerve**, v. 31, n. 4, p. 452-460, Jul 2005

HAYASHI A, PANNUCCI C, MORADZADEH A, KAWAMURA D, MAGILL C, HUNTER DA, TONG AY, PARSADANIAN A, MACKINNON SE, MYCKATYN TM. Axotomy or compression is required for axonal sprouting following end-to-side neurorrhaphy. **Experimental Neurology**, v. 211, n. 2, p. 539-550, Jun 2008.

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

HE Q, DENT EW, MEIRI KF. Modulation of Actin Filament Behavior by GAP-43 (Neuromodulin) Is Dependent on the Phosphorylation Status of Serine 41, the Protein Kinase C Site. **The Journal of Neuroscience**, v 17, n. 10, p. 3515-3524, Maio 1997

HOBSON MI, BROWN R, GREEN CJ, TERENCE G. Inter-relationships between angiogenesis and nerve regeneration: a histochemical study. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 50, n. 2, p. 125-131, Feb 1997.

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

HOHENESTER E, YURCHENCO PD. Laminins in basement membrane assembly. **Cell Adhesion and Migration**, v. 7, n. 1, p 56-63, Jan 2013.

HOLAHAN MR. GAP-43 in synaptic plasticity: molecular perspectives. **Research and Reports in Biochemistry**, v. 5 p. 137–146, 2015.

HSU SH, KUO WC, CHEN YT, YEN CT, CHEN YF, CHEN KS, HUANG WC, CHENG H. New nerve regeneration strategy combining laminin-coated chitosan conduits and stem cell therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 5, p. 6606-15, May 2013.

ISOBE T, OKOYUMA T. The amino acid sequence of the S100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium binding proteins, **European Journal of Biochemistry**, v. 89, n. 2, p. 379–388, Set 1978.

Jenq CB, Coggeshall RE. Nerve regeneration through holey silicone tubes. **Brain Research**, v. 361, n. 1-2, p. 233-41, Dec 1985.

JONES KJ, KINDERMAN NB, OBLINGER MM. Alterations in Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) mRNA Levels in the Hamster Facial Motor Nucleus: Effects of Axotomy and Testosterone. **Neurochemical Research**, v. 22, n. 11, p. 1359-1366, Nov 1997.

JOSEPHINE M. J. STOFFELS, CHAO ZHAO, WIA BARON. Fibronectin in tissue regeneration: timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 22, p. 4243–4253, Nov 2013.

KALBERMATTEN DF, PETTERSSON J, KINGHAM PJ, PIERER G, WIBERG M, TERENCEHI G. New Fibrin Conduit for Peripheral Nerve Repair. **Journal of reconstructive Microsurgery**, v. 25 n.1, p. 027-033, Jan 2009.

KORSHUNOVA I, MOSEVITSKY M. Role of the growth-associated protein GAP-43 in NCAM-mediated neurite outgrowth. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 663, p. 169-82, Nov 2010.

KOVACIC U, ZELE T, TOMSIC M, SKETELJ J, BAJROVIC FF. Influence of breaching the connective sheaths of the donor nerve on its myelinated sensory axons and on their sprouting into the end-to-side coapted nerve in the rat. **Journal of Neurotrauma**, v. 29, n. 18, p. 2805-2815. Dec 2012.

KREWSON CE, CHUNG SW, DAI W, SALTZMAN MW. Cell aggregation and neurite growth in gels of extracellular matrix molecules. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 7, p. 555-62, Mar 1994.

KUBEK T, KÝR M, HANINEC P, SÁMAL F, DUBOVÝ P. Morphological evidence of collateral sprouting of intact afferent and motor axons of the rat ulnar nerve demonstrated by one type of tracer molecule. **Annals of Anatomy**, v. 186, n. 3, p. 231-4, Jun 2004.

LABRADOR RO, BUTÍ M, NAVARRO X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. **Experimental Neurology**, v. 149, n. 1, p. 243-52, Jan 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**, v. 459, n. 1, p. 93-104, Agst 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**, v. 184, n. 1, p. 295-303, Nov 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**, v. 33, n. 35, p. 9027-36, Dec 2012.

LEFCORT F, VENSTROM K, MCDONALD JA, REICHARDT LF. Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve. **Development**, v. 116, n. 3, p. 767-782, Dec 1992.

LEWIT-BENTLEY A, RÉTY S. EF-hand calcium-binding proteins. **Current Opinions in Structural Biology**, v. 10, n. 6, p. 637-43, Dec 2000.

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**, v. 11, n. 4, p. 682-686, Abril 2016.

LI J, ZHANG Y-P, KIRSNER RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 1, p. 107-114, Jan 2003.

LITTLE MK, ZOMORODI AR, SELZNICK LA, FRIEDMAN HA. An eclectic history of peripheral nerve surgery **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 15, n. 2, p. 109-123, Abril 2004.

LIU F, ZHANG H, ZHANG K, WANG X, LI S, YIN Y. Rapamycin promotes Schwann cell migration and nerve growth factor secretion. **Neural Regeneration Research**, v. 9, n. 6, p. 602-609, Mar 2014.

LIU W, BOSTRÖM M & RASK-ANDERSEN H. Expression of peripherin in the pig spiral ganglion – aspects of nerve injury and regeneration. **Acta Oto-Laryngologica**, v.129, n. 6, p. 608-614, Jun 2009.

LOHMEYER JA, SIEMERS F, MACHENS HG, MAILÄNDER P. The clinical use of artificial nerve conduits for digital nerve repair: a prospective cohort study and literature review. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 25, n. 1, p. 55-61, Jan 2009.

LONGO FM, MANTHORPE M, SKAPER SD, LUNDBORG G, VARON S. Neuronotrophic activities accumulate in vivo within silicone nerve regeneration chambers. **Brain Research**, v. 261, n. 1, p. 109-16, Fev 1983A.

LONGO FM, SRAPER SD, MANTHORPE M, WILLIANS LR, LUNDBORG G, AND VARON S. Temporal changes in neuronotrophic activities accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. **Experimental Neurology**, v. 81, n. 3, p. 756-769, Set 1983B.

LONGO FM, HAYMAN EG, DAVIS GE, RUOSLAHTI E, ENGVALL E, MANTHORPE M, & VARON S. Neurite-promoting factors and extracellular matrix components accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. **Brain Research**, v. 309, n. 1, p. 105–117, Agst 1984.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N. Ulnar Nerve repair by the silicone chamber technique. Case report. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 25, n. 1, p. 79-82, 1991.

LUNDBORG G, ROSEN B, DAHLIN L, HOLMBERG J, ROSEN I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. **Journal of Hand Surgery**, v. 29, n. 2, p. 100–107, Abril 2004.

MACKENZIE F, RUHRBERG C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. **Development**, v. 139, n. 8, p. 1371-1380, Abril 2012.

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**, v. 88, n. 3, p. 767-72, Jun 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**, v. 27, n. 1, p. 27-31, Jan 2007.

MARENHOLZ I, HEIZMANN CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, n. 4, p. 1111-1122, Oct 2004.

MARKO SB, DAMON DH. VEGF promotes vascular sympathetic innervation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 6, p. 2646-2652, Jun 2008.

MATA M, ALESSI D, FINK DJ. S100 is preferentially distributed in myelin-forming Schwann cells. **Journal of Neurocytology**, v. 19, n. 3, p. 432–442, June 1990.

MATSUOKA I, NAKANE A, KURIHARA K. Induction of LIF-mRNA by TGF-beta 1 in Schwann cells. **Brain Research**, v. 776, n. 1-2, p.170-180, Nov 1997.

MATSUMOTO K, EMA M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. **Journal of Biochemistry**, v. 156, n. 1, p. 1-10, Jul 2014.

MCDONALD D, CHENG C, CHEN YY, ZOCHODNE D. Early events of peripheral nerve regeneration. **Neuron Glia Biology**, v. 2, n. 2, p. 139–147, Maio 2006.

MCGRATH AM, NOVIKOVA LN, NOVIKOV LN, WIBERG M. BD™ PuraMatrix™ peptide hydrogel seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. **Brain Research Bulletin**, v. 83, n. 5, p. 207-13 Oct, 2010.

MENCARELLI C, CIOLFI S, CAROTI D, LUPETTI P, DALLAI R. Isomin: a novel cytoplasmic intermediate filament protein from an arthropod species. **BMC Biology**, v. 28, n. 1, p. 9-17, Feb 2011.

MIDHA R, MUNRO CA, DALTON PD, TATOR CH, SHOICHET MS. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. **Journal of Neurosurgery**, v. 99, n. 3, p. 555–565, Set 2003.

MINER JH, YURCHENCO PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annual Review of Cell and Development Biology**. v. 20, p. 255-284, Nov 2004.

MOORE BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 19, n. 6, p. 739-44, Jun 1965.

MOUW JK, OU G, WEAVER VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 771-85, Dec 2014.

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

NGEOW WC. Scar less: a review of methods of scar reduction at sites of peripheral nerve repair. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 109, n. 3, p. 357-366, Mar 2010.

NIE X, ZHANG YJ, TIAN WD, JIANG, M., DONG, R., CHEN, J.W., JIN, Y. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 361, n. 1, p. 32-8, Jan 2007.

OOSTHUYE B, ET AL. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. **Nature Genetics**, v. 28, n. 2, p. 131-8, Jun 2001.

PARRY DA, STRELKOV SV, BURKHARD P, AEBI U, HERRMANN H. Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 10, p. 2204-2216, Apr 2007.

PLANTINGA LC, VERHAAGEN J, EDWARDS PM, HOL EM, BÄR PR, GISPEN WH. The expression of B-50/GAP-43 in Schwann cells is upregulated in degenerating

peripheral nerve stumps following nerve injury, **Brain Research**, V. 602, n. 1, p. 69-76, Jan 1993.

POLA R, APRAHAMIAN TR, BOSCH-MARCÉ M, CURRY C, GAETANI E, FLEX A, SMITH RC, ISNER JM, LOSORDO DW. Age-dependent VEGF expression and intraneural neovascularization during regeneration of peripheral nerves. **Neurobiology of Aging**, v. 25, n. 10, p. 1361-1368, Nov 2004.

PREVITALI SC, FELTRI ML, ARCHELOS JJ, QUATTRINI A, WRABETZ L, HARTUNG H. Role of integrins in the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 1, p. 35-49, Maio 2001.

RUIFROK AC, JOHNSTON DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **Analitical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 23, n. 4, p.291-9, Ago 2001.

SBAI O, DEVI TS, MELONE MA, FERON F, KHRESTCHATISKY M, SINGH LP, PERRONE L. RAGE-TXNIP axis is required for S100B-promoted Schwann cell migration, fibronectin expression and cytokine secretion. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4332-4339, Nov 2010.

SCARAVILLI, F. "Regeneration of the perineurium across a surgically induced gap in a nerve encased in a plastic tube". **Journal of anatomy**, v. 139, n. 3, p. 411-24, Out 1984.

SEDAGHAT F AND NOTOPOULOS A. S100 protein family and its application in clinical practice. **Hippokratia**, v. 12, n. 4, p. 198–204, Out 2008.

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

SNIPES GJ, CHAN SY, MCGUIRE CB, COSTELLO BR, NORDEN JJ, FREEMAN JA, ROUTTENBERG A. Evidence for the coidentification of GAP-43, a growth-associated protein, and F1, a plasticity-associated protein. **Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 12, p 4066-4075, Dec 1987.

SORCI G, AGNELETTI AL, DONATO R. Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. **Neuroscience**, v. 99, n. 4, p. 773-783, Jul 2000.

SORCI G, RIUZZI F, ARCURI C, TUBARO C, BIANCHI R, GIAMBANCO I, DONATO R. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 1-12, Feb 2013.

STAFFORD CA, SHEHAB SA, NONA SN, CRONLY-DILLON JR. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in goldfish optic nerve following injury. **Glia**, v. 3, n. 1, p. 33-42, 1990.

STOFFELS JM, ZHAO C, BARON W. Fibronectin in tissue regeneration: timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build. **Cell Mol Life Sci**. 70(22):4243-53, Nov 2013.

STOOKEY B. Surgical and Mechanical Treatment of Peripheral Nerver. **Saunders, Philadelphia.** 1922.

STRACHAN LR, CONDIC ML. Neural crest motility on fibronectin is regulated by integrin activation. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 3, p. 441-52, 2008.

SUN FY, GUO X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. **Journal of Neuroscience Research** ; 79: 180-4, 2005.

SVIIENSKA I, DUBOV P, EASTNA M. Immunohistochemical study of the extracellular matrix formed during peripheral nerve regeneration through a knitted prosthesis. **SCRIPTA MEDICA (BRNO)**, v. 74, n. 3, p. 221–230, Aug 2001.

TANG J, HUA Y, SU J, ZHANG P, ZHU X, WU L, NIU Q, XIAO H, DING X. Expression of vascular endothelial growth factor and neural repair after alprostadil treatment of sciatic nerve crush injury. **Neurology India**, v. 57, n. 4, p. 387-394, Aug 2009.

TANIUCHI M, CLARK HB, JOHNSON EM. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 83, p. 4094-4098, 1986.

TAYLOR CA, BRAZA D, RICE JB, DILLINGHAM T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, v. 87, n. 5, p. 381-385, Maio 2008.

TERRIS DJ, TOFT KM, MOIR M, LUM J, WANG M. Brain-derived neurotrophic factorenriched collagen tubule as a substitute for autologous nerve grafts. **Archievs of Otolaryngology Head and Neck Surgery**, v. 127, n. 3, p. 294–298, Mar 2001.

TERZIS J, FAIBISOFF B, WILLIAMS B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. **Plastic and Reonstrutive Surgery**, v. 56, .n 2, p.166-167, Ago 1975.

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

TING J, HU G, MARIN VP. End-to-side neurorrhaphy using autogenous vein nerve conduits. **Surgical Forum**. v 49, p. 637–638, 1998a.

TING J, HU G, MARIN VP. End-to-side nerve anastomosis using autogenous vein nerve conduits . **Journal of Reconstructive Microsurgery**. n. 14, p. 591, 1998b.

TO WS, MIDWOOD KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 21, n. 4, p. , Set 2011.

TRIOLO D, GIORGIA DINA G, LORENZETTI I, MALAGUTI MC, MORANA P, DEL CARRO U, GIANCARLO COMI, ALBEE MESSING, ANGELO QUATTRINI, STEFANO C. PREVITALI. Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs

Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 9, p. 3981-3993, Out 2006.

UEDA K, AKIYOSHI K, SUZUKI Y, OHKOUCHI M, HIROSE T, ASAI E, ET AL. Combination of hypoglossal-facial nerve jump graft by end-to-side neurorrhaphy and cross-face nerve graft for the treatment of facial paralysis. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 23, n. 4, p. 181-187, Maio 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**, v. 23, n. 1, p. 40-48, Jan 2003.

UZMAN BG, VILLEGAS GM, Mouse sciatic nerve regeneration through semipermeable tubes: A quantitative model. **Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 325-338, 1983.

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**, v. 32, n. 9, p. 697-705, Nov 2017.

VITERBO F, TRINDADE JC, HOSHINO K, MAZZONI A. Two end-to-side neurorrhaphies and nerve graft with removal of the epineural sheath: experimental study in rats. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 47, n. 2, p.75–80, Mar 1994a.

VITERBO F, TRINDADE JC, HOSHINO K, MAZZONI A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. **Plastic and Reconstructive Surgery and the Transplantation Bulletin**, v. 94, n. 7, p. 1038–1047, Dec 1994b.

VITERBO F, TRINDADE JC, HOSHINO K, MAZZONI A. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineural sheath. Experimental study in rats. **Revista Paulista de Medicina**, v. 110, n. 6, p. 267-75, Nov - Dec 1992.

VITERBO, F, TEIXEIRA E, HOSHINO K, PADOVANI CR. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. **Revista Paulista de Medicina**, v. 116, n. 5, p. 1808-14, Set - Out 1998.

VOGELEZANG MG, SCHERER SS, FAWCETT JW. Regulation of fibronectin alternative splicing during peripheral nerve repair. **Journal of Neuroscience Research**, v. 56, n. 4, p. 323–333. Maio 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**, v, 140, p. 423-9, 1850.

WALLQUIST W, PATARROYO M, THAMS S, CARLSTEDT T, STARK B, CULLHEIM S, HAMMARBERG H. Laminin chains in rat and human peripheral nerve: distribution and regulation during development and after axonal injury. **Journal of Comparative Neurology**, v. 454, n. 3, p. 284-93, Dec 2002.

WANG S, LI X, PARRA M, VERDIN E, BASSEL-DUBY R, OLSON EN. Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 105, n. 22, p. 7738-7743, Jun 2008.

WINDEBANK AJ, PODUSLO JF. Neuronal growth factors produced by adult peripheral nerve after injury. **Brain Research**, v. 385, n. 1, p.197-200, Out 1986.

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**, v. 218, n. 4, p. 460-70, Abril 1983.

WILLIAMS LR, VARON S. Modification of fibrin matrix formations in situ enhances nerve regeneration in silicone chamber. **Journal of Comparative Neurology**, v. 231, n. 1, p. 209-220, Jan 1985.

WILLIAMS LR., HENRY PC, GORAN LUNDBORG G AND VARON S. Competence of Nerve Tissue as Distal Insert Promoting Nerve Regeneration in a Silicone Chamber. **Brain Research**, v. 293, n. 2, p. 201-211, Fev 1984.

WOFCHUK ST, RODNIGHT R. Age-dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. **Developmental Brain Research**, v. 85, n. 2, p. 181-186, Abril 1995.

XU QG, MIDHA R, MARTINEZ JA, et al. Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 877–887, Abril 2008.

YANG Z, WANG KW. Glial Fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. **Trends in Neuroscience**, v. 38, n. 6, p. 364–374, Jun 2015.

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**, v. 33, n. 3, p. 151-6, Mar 2000.

YE Y, LI L, LI Q, Identification Of Proteins In Fluid Collected From Nerve Regeneration Chambers. **Archives of Biological Sciences Belgrade**, v. 66, n. 3, p. 1035-1039, Mar 2014.

YONG M, JEAN ES. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. **Matrix Biology**, v. 24, n. 6, p. 389 – 399, Set 2005.

YOSHIZAWA H, SENDA D, NATORI Y, TANAKA R, MIZUNO H, HAYASHI. A End-to-Side Neurorrhaphy as Schwann Cells Provider to Acellular Nerve Allograft and Its Suitable Application. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1 - 18, Dec 2016.

YU WM, FELTRI ML, WRABETZ L, STRICKLAND S, CHEN ZL. Schwann cell-specific ablation of laminin gamma1 causes apoptosis and prevents proliferation. **The Journal of Neuroscience**. v. 25 n. 18, p. 4463-4472, Maio 2005.

YU X, DILLON GP, BELLAMKONDA RB. A laminin and nerve growth factor-laden three-dimensional scaffold for enhanced neurite extension. **Tissue Engineering**, v. 5, n. 4, p. 291-304, Aug 1999.

YUAN Q, HU B, SU H, SO KF, LIN Z, WU W. GAP-43 expression correlates with spinal motoneuron regeneration following root avulsion. **Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury**, v 18, n. 4, p. 1-18, Out 2009.

ZHANG PX, LI-YA A, KOU YH, YIN XF, XUE F, HAN N, WANG TB, JIANG BG. Biological conduit small gap sleeve bridging method for peripheral nerve injury: regeneration law of nerve fibers in the conduit. **Neural Regeneration Research**, v. 10, n. 1, p. 71-78, Jan 2015.

ZHANG SJ, WU WL, YANG KY, CHEN YZ, LIU HC. Phenotypic changes of Schwann cells on the proximal stump of injured peripheral nerve during repair using small gap conduit tube. **Neural Regeneration Research**, v. 12 n. 9, p. 1538-1543, Set 2017.

ZHENG M, KUFFLER DP. Guidance of regenerating motor axons in vivo by gradients of diffusible peripheral nerve-derived factors. **Journal of Neurobiology**, v. 42, n. 2, p. 212-9, Feb 2000.

ZIMMER DB, VAN ELDIK LJ. Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and S100-binding proteins. **American Journal of Physiology**, v. 252, n. 3, p. 285-9, Mar 1987.

ANEXOS

Expressão de proteínas

Juntamente com as amostras dos grupos experimentais, foram adicionados controles positivos e negativos para validação dos anticorpos e para evitar falsos resultados negativos. Os resultados estão descritos na figura 1 e na tabela 1.

Figura 1. Densidade relativa dos controles positivos e negativos. O nervo fibular controle foi utilizado como referência para normalizar os valores dos grupos. O controle negativo consistiu de 10 μ l de tampão de Lemilli.

Tabela 1. Densidade relativa dos controles positivos e negativos.

Proteína	Controle positivo	Controle negativo	Tecido
VEGF	$0,52 \pm 0,19$	$0,19 \pm 0,17$	Artéria
S100	$0,56 \pm 0,21$	$0,21 \pm 0,11$	Cérebro
Laminina	$1,09 \pm 0,33$	$0,33 \pm 0,06$	Pele
Fibronectina	$1,89 \pm 0,30$	$0,3 \pm 0,12$	Fígado
GFAP	$0,45 \pm 0,08$	$0,08 \pm 0,02$	Cérebro
GAP43	$1,23 \pm 0,18$	$0,17 \pm 0,12$	Cérebro

O nervo fibular controle foi utilizado como referência para normalizar os valores dos grupos. O controle negativo consistiu de 10 μ l de tampão de Lemilli. O tecido utilizado como controle positivo está descrito na última coluna.