

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/08/2025.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

KEVIN SILVA MULLER

**Implicações da reconstrução nervosa experimental
associada ao biopolímero heterólogo
de fibrina no sistema nervoso central e periférico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Medicina Translacional, Área de Biologia Geral.

Orientador(a): Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus
Coorientador(a): Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta-Júnior

**Botucatu, São Paulo
2024**

Kevin Silva Muller

Implicações da reconstrução nervosa experimental
associada ao biopolímero heterólogo
de fibrina no sistema nervoso central e periférico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Medicina Translacional, Área de Biologia Geral.

Área de Concentração: Reparação, Regeneração e Transplante de Órgãos e Tecidos.

Área de Conhecimento: Biologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus
Coorientador: Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta-Júnior

Botucatu, São Paulo
2024

M958i Muller, Kevin Silva
 Implicações da reconstrução nervosa
 experimental associada ao biopolímero heterólogo
 de fibrina no sistema nervoso central e periférico /
 Kevin Silva Muller. -- Botucatu, 2024
 150 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
 Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
 Orientadora: Selma Maria Michelin Matheus
 Coorientadora: Jose de Anchieta de Castro e
 Horta Júnior

1. neurorafia. 2. medicina regenerativa. 3. tato. I.
 Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
 Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de
 Medicina, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impactos sociais

A lesão nervosa é uma condição devastadora que afeta a qualidade de vida dos pacientes, limitando a mobilidade e a autonomia (ODS 3: Saúde e Bem-estar). O biopolímero heterólogo de fibrina associado ao reparo representa um avanço na medicina regenerativa ao criar um ambiente mais favorável à regeneração, mitigando a degeneração e a atrofia muscular. Isso pode levar a uma melhora significativa nas capacidades motoras dos pacientes.

Social impacts

Nerve injury is a devastating condition that affects patients' quality of life, limiting mobility and autonomy (SDG 3: Good Health and Well-being). The heterologous fibrin biopolymer associated with repair represents an advance in regenerative medicine by creating a more favorable environment for regeneration, mitigating degeneration and muscle atrophy. This can lead to a significant improvement in patients' motor abilities.



UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE KEVIN SILVA MULLER, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E MEDICINA TRANSLACIONAL, DA FACULDADE DE MEDICINA.

Aos 24 dias do mês de julho do ano de 2024, às 08:30 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de KEVIN SILVA MULLER, intitulada **Implicações da reconstrução nervosa experimental associada ao biopolímero heterólogo de fibrina no sistema nervoso central e periférico**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. SELMA MARIA MICHELIN MATHEUS (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto de Biologia Estrutural e Funcional / IB/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. CRISTINA GUATIMOSIM FONSECA (Participação Virtual) do(a) Depto. de Morfologia / ICB/Belo Horizonte - UFMG, Profa. Dra. LUCIANA POLITTI CARTAROZZI (Participação Virtual) do(a) Depto. de Biologia Estrutural E Funcional / IB/Campinas - Unicamp. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Documento assinado digitalmente
SELMA MARIA MICHELIN MATHEUS
Data: 31/07/2024 15:16:14-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. SELMA MARIA MICHELIN MATHEUS

Aos indivíduos que enfrentam as dificuldades e desafios das lesões traumáticas de nervo.

Que este trabalho contribua para a ciência e para o desenvolvimento de tratamentos que garantam a recuperação e a qualidade de vida desses pacientes.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jurg e Creusa, e meu irmão, Lívio, que sempre deram todo o apoio, suporte e estrutura para que eu pudesse ter chegado tão longe hoje. Embora distantes fisicamente, vocês sempre estiveram por perto.

A professora Dra. Selma Maria Michelin Matheus, por mais uma vez acreditar no meu trabalho e me capacitar, e por contribuir e compartilhar suas experiências, além da confiança e disposição para abraçar a realização dessa dissertação, enquanto também me permitiu seguir explorando por outros rumos que não só a pesquisa, me incentivando a desenvolver ainda mais minha paixão pela extensão e divulgação científica.

Ao professor Dr. José de Anchieta por ter aceitado me co-orientar e participar desta empreitada, contribuindo grandemente para sua execução, sempre servindo como um exemplo excepcional não só de professor e cientista, mas também de pessoa.

Aos meus companheiros de casa da república Caverna do Dragão e em especial as “Jullies” que proporcionaram experiências e momentos fabulosos que ficaram marcados pra sempre. Até o impossível ficou mais possível e alcançável com o apoio de vocês.

Aos meus colegas dos laboratórios Fefo, Youssef, Higor, Stephane, Ygor, Verônica e Gabrielly, que contribuíram enormemente para que os dias no laboratório fossem muito mais do que trabalho. Vocês transformaram o ambiente em um espaço de diversão e companheirismo, repleto de ótimos momentos e boas histórias. Tornaram todos os bons pratos, congressos e passeios muito mais significativos.

A professora Dra. Carla de Moraes e professora Dra. Cíntia Matsumura pelo apoio e revisões ao longo das bancas de acompanhamento. Suas contribuições foram muito importantes para a construção do trabalho, seu desenvolvimento e resultado final.

Aos membros da minha banca de qualificação, professora Dra. Elaine Minatel e professor Dr. Rogério Buchaim pelas muitas contribuições que ajudaram a tornar esse trabalho mais completo e coeso, além de me incentivar a continuar trabalhando e desenvolvendo novas abordagens de investigação.

A professora Dra. Luciana Cartarozzi e professora Dra. Cristina Guatimosim que além de diversas contribuições também tornaram a concretização destes anos de trabalho um momento ainda mais memorável através de uma bela arguição.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e a Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex) por toda a infraestrutura e apoio técnico e físico, que foram indispensáveis para a realização deste trabalho. Em especial, aos servidores Luciene de Almeida, Rinaldo Ortiz, Ricardo Teixeira, Leandro Alves e a Vanda Tofoli.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Medicina Translacional pelos diversos apoios técnicos e financeiros para o meu próprio desenvolvimento e também do projeto. Em especial, a Márcia Fonseca, secretária do programa, pela enorme ajuda com burocracias, cordialidade e disponibilidade.

Agradeço ao Centro de Microscopia Eletrônica do IBB, a professora Dra. Daniela Carvalho e a Claudete Tardivo, Thiago Tardivo, Marilena e Shelly Favorito pela enorme disponibilidade, ajuda técnica e capacitação para preparo de amostras e visualização para microscopia eletrônica.

Também agradeço a todos os amigos que já passaram e que foram feitos ao longo desta grandiosa jornada por Botucatu.

Aos animais que tiveram suas vidas cedidas involuntariamente para a realização deste trabalho.

E a Gabriela Larissa, obrigado por tudo. Você me ajudou a me tornar uma pessoa melhor. Independente de onde e como estivermos, sempre haverá uma parte de você em mim. Eu sou grato por isso.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) com a concessão de bolsa de pesquisa nível Mestrado (processo 2022/07551-1).

*“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.*

O que ela quer da gente é coragem.”

- João Guimarães Rosa. Grande Sertão: Veredas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema ilustrativo da unidade motora – página 16.

Figura 2. Organização da junção neuromuscular – página 18.

Figura 3. Classificação das lesões nervosas – página 22.

Figura 4. Mudanças desencadeadas pela lesão nervosa – página 24.

Figura 5. Eventos celulares e moleculares associados à desnervação e reparo muscular ao nível da junção neuromuscular – página 28.

Figura 6. Diagrama demonstrativo dos estudos para revisão de escopo – página 38.

Figura 7. Fotografias do procedimento de cirurgia experimental – página 40.

Figura 8. Procedimento de injeção do neurotraçador Fluorogold – página 41.

Figura 9. Imagem representativa de medida automatizada utilizando o software AxonDeepSeg – página 45.

Figura 10. Representações para análise de densitometria óptica e contagem de células marcadas por IBA-1 – página 49.

Figura 11. Representações do procedimento utilizado para realização da reconstrução 3D – página 50.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina	PBS – Tampão fosfato salino
AChE – Acetilcolinesterase	PCL – Policaprolactona
ANOVA – Análise de variância paramétrica	RIPA – Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
BHF – Biopolímero Heterólogo de Fibrina	SEM – Erro padrão da média
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo	S100 – Proteína S100
BSA – Albumina sérica bovina	TBS-T – Tampão tris salino com Tween 20
C – Grupo Controle	TNF- – Fator de Necrose Tumoral
CEVAP – Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos	tSCs – células de Schwann terminais
D – Grupo Desnervado	UNESP – Universidade Estadual Paulista
DAMPS – padrões moleculares associados a danos	UNIPEX – Unidade de Pesquisa Experimental
DBEF – Departamento de Biologia Estrutural e Funcional	v – Versão
DAB-Ni – 3,3' diaminobenzidina-tetrahydrocloreto intensificado com níquel amônio sulfato	VACHT – Transportador vesicular de acetilcolina
Dok7 – Proteína Docking 7	VGLUT-1 – Transportador Vesicular Glutamatérgico 1
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	(w/v) – peso/volume
HE – Hematoxilina e Eosina	(v/v) – volume/volume
HRP – Horseradish Peroxidase	% – Porcentagem
FG - Fluorogold	® – Marca registrada
FMB – Faculdade de Medicina de Botucatu	h – Horas
IL – Interleucina	HCl – Ácido clorídrico
JNM – Junção neuromuscular	kg – Kilogramas
LRP4 – Receptor lipoproteico relacionado a proteína 4	m – Metro
MMP3 – Metaloproteinase de matriz 3	M – Molar / mol por litro
MRFs – Fatores de regulação miogênica	mg – Miligramas
MuSK – Receptor tirosina quinase músculo-específico	min – Minutos
MyoD – Myoblast Determination Protein 1	mL – Mililitros
N – Grupo Neurorrafia	mm – Milímetros
NF200 – Proteína Neurofilamento 200	°C – Graus Celsius
nAChRs – Receptores nicotínicos de acetilcolina	p – Probabilidade de significância
NB – Grupo Neurorrafia + BHF	pH – Potencial hidrogeniônico
	SP – São Paulo
	x – Vezes
	α – Alfa
	γ – Gama
	μL – Microlitros
	μm – Micrômetros

SUMÁRIO

Lista de ilustrações	10
Lista de abreviaturas	11
Resumo	13
Abstract	14
Introdução	15
<i>Estrutura e função do sistema nervoso</i>	15
<i>Junção Neuromuscular</i>	19
<i>Lesões nervosas</i>	22
<i>Patofisiologia da lesão nervosa</i>	25
<i>Abordagens de reparo após lesão</i>	31
<i>Biopolímero Heterólogo de Fibrina</i>	32
Justificativa	35
Objetivos	36
Material e métodos	37
Revisão bibliográfica	37
Animais	38
Procedimento cirúrgico	39
Coleta do material biológico	42
Estudos do SNP	43
Estudos do SNC	47
Referências Bibliográficas	52
Capítulo 1	57
Capítulo 2	87
Capítulo 3	113
Conclusão	147
Anexo 1 (Certificados CEUA)	148
Anexo 2 (Tabela de Anticorpos utilizados)	150

RESUMO

Lesões nervosas representam desafios significativos para a clínica médica devido à sua ocorrência frequente e impacto substancial na qualidade de vida. A secção completa do nervo resulta no bloqueio da condução nervosa, levando a mudanças no sistema nervoso à medida que uma série de respostas patofisiológicas e metabólicas ocorrem para estabilizar e reparar os tecidos lesionados. O primeiro grande desafio é manter os neurônios lesionados vivos e posteriormente gerenciar o crescimento dos axônios. Outra preocupação crítica surge da interrupção das conexões nervo-músculo e degeneração das junções neuromusculares (JNMs), levando à atrofia e perda substancial da função muscular. A técnica padrão ouro, neurografia, é insuficiente para alcançar uma recuperação motora significativa e, portanto, novas técnicas estão sendo estudadas. Um candidato adjunto promissor é o biopolímero de fibrina heterólogo (BHF), que é livre de componentes humanos e vêm exibindo potencial notável para regeneração de lesões periféricas e da medula espinhal. No entanto, perguntas sobre seus efeitos regenerativos tardios para a interação nervo-músculo e na medula espinhal após lesão nervosa permanecem inexploradas. Portanto, investigamos os efeitos da reconstrução nervosa via neurografia associada ao BHF 120 dias após a lesão e reparo do nervo isquiático em ratos Wistar, abordando aspectos do sistema nervoso periférico - nervo, JNM e músculo associado - e do sistema nervoso central - neurônios motores inferiores e microglia da medula espinhal. Para isso, quarenta e quatro ratos Wistar machos adultos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Controle (C), em que o nervo isquiático direito foi visualizado; Denervado (D), em que a neurotome foi realizada com remoção de um fragmento de 6 mm do nervo isquiático; Neurografia (N), em que após neurotome os cotos do nervo isquiático foram reconectados por neurografia; e Neurografia + BHF (NB), no qual o BHF foi adicionado após a mesma neurografia. Aos 105 dias pós-lesão, o neurotraçador Fluorogold (FG) foi aplicado no músculo tibial cranial direito para marcação retrógrada dos neurônios motores na coluna anterior da porção lombar (L2-L5) da medula espinhal. Aos 120 dias, foi realizada coleta a fresco ou perfusão transcardíaca para obtenção das medulas espinhais, dos nervos isquiáticos e fibulares e dos músculos tibiais craniais. Em relação ao eixo nervo-músculo, para o nervo fibular, foi observado aumento no número de axônios intactos no grupo NB, resultando em aumento na frequência de axônios, referentes à razão G/diâmetro do axônio. Com relação às JNMs, o grupo NB apresentou aproximação morfológica ao grupo C, e também aumento na expressão da subunidade alfa-1 do nAChR e da proteína Rapsina. Tomados em conjunto, esses resultados contribuíram para a recuperação muscular, em que os grupos NB e C exibiram resultados morfométricos de fibras musculares saudáveis. Em relação a medula espinhal, ultraestruturalmente, os grupos NB e N apresentaram neurônios com sinais de preservação de suas organelas, embora alguns indicadores de lesão também tenham sido observados. A reinervação e o fluxo de FG do músculo para a medula espinhal foi observada nos grupos C, N e NB, onde no grupo NB foi observado maior número de neurônios marcados quando comparado ao grupo N. Destaca-se ainda que no grupo NB houve menor dispersão dos neurônios motores estando mais próximo ao grupo C. O mesmo ocorreu em relação às células da microglia e à topografia do nervo isquiático. Os resultados observados neste estudo indicam que o BHF promoveu maior sobrevivência dos neurônios motores e consequentemente melhor reinervação, levando a um aumento no número de axônios regenerados e retorno morfológico da JNMs, desse modo, prevenindo a degeneração muscular. Esses resultados destacam os efeitos benéficos do BHF no reparo do nervo, superando aqueles alcançados apenas pela neurografia. Como um todo, destacamos os efeitos benéficos tardios do BHF na reparação da lesão e asseguram seu potencial para superar os efeitos de regeneração alcançados pela neurografia sozinha, endossando o BHF como um bioproduto promissor para ensaios clínicos.

ABSTRACT

Nerve injuries represent significant challenges for medical practice due to their frequent occurrence and substantial impact on quality of life. Complete nerve transection results in the blockade of nerve conduction, leading to changes in the nervous system as a series of pathophysiological and metabolic responses occur to stabilize and repair the injured tissues. The first major challenge is to keep the injured neurons alive and subsequently manage axonal growth. Another critical concern arises from the disruption of nerve-muscle connections and degeneration of neuromuscular junctions (NMJs), leading to atrophy and substantial loss of muscle function. The gold standard technique, neurorrhaphy, is insufficient to achieve significant motor recovery, and therefore, new techniques are being studied. A promising adjunct candidate is the heterologous fibrin biopolymer (HFB), which is free of human components and has shown remarkable potential for the regeneration of peripheral and spinal cord injuries. However, questions about its late regenerative effects on nerve-muscle interaction and the spinal cord after nerve injury remain unexplored. Therefore, we investigated the effects of nerve reconstruction via neurorrhaphy associated with HFB 120 days after injury and repair of the sciatic nerve in Wistar rats, addressing aspects of the peripheral nervous system - nerve, NMJ, and associated muscle - and the central nervous system - lower motor neurons and spinal cord microglia. For this, forty-four adult male Wistar rats were randomly distributed into four experimental groups: Control ©, where the right sciatic nerve was visualized; Denervated (D), where neurotmesis was performed with removal of a 6 mm fragment of the sciatic nerve; Neurorrhaphy (N), where after neurotmesis the stumps of the sciatic nerve were reconnected by neurorrhaphy; and Neurorrhaphy + HFB (NB), where HFB was added after the same neurorrhaphy. At 105 days post-injury, the neurotracer Fluorogold (FG) was applied to the right cranial tibial muscle for retrograde labeling of motor neurons in the anterior column of the lumbar portion (L2-L5) of the spinal cord. At 120 days, fresh collection or transcardiac perfusion was performed to obtain the spinal cords, sciatic and fibular nerves, and cranial tibial muscles. Regarding the nerve-muscle axis, for the fibular nerve, an increase in the number of intact axons was observed in the NB group, resulting in an increase in axon frequency, referring to the G-ratio/axon diameter. Regarding the NMJs, the NB group showed morphological approximation to the C group, and also an increase in the expression of the alpha-1 subunit of the nAChR and the protein Rapsyn. Taken together, these results contributed to muscle recovery, where the NB and C groups exhibited morphometric results of healthy muscle fibers. Regarding the spinal cord, ultrastructurally, the NB and N groups presented neurons with signs of preservation of their organelles, although some injury indicators were also observed. Reinnervation and FG flow from the muscle to the spinal cord were observed in the C, N, and NB groups, where the NB group showed a higher number of labeled neurons compared to the N group. It is also noteworthy that in the NB group there was less dispersion of motor neurons, being closer to the C group. The same occurred in relation to microglial cells and the topography of the sciatic nerve. The results observed in this study indicate that HFB promoted greater survival of motor neurons and consequently better reinnervation, leading to an increase in the number of regenerated axons and morphological return of the NMJs, thus preventing muscle degeneration. These results highlight the beneficial effects of BHF on nerve repair, surpassing those achieved by neurorrhaphy alone. Overall, we emphasize the late beneficial effects of BHF in injury repair and affirm its potential to exceed the regenerative effects achieved by neurorrhaphy alone, endorsing BHF as a promising bioproduct for clinical trials.

1. Introdução

1.1. *Estrutura e função do sistema nervoso*

Os nervos periféricos são estruturas frágeis e delicadas, propensos a serem facilmente danificados por lesões como compressões, esmagamentos e traumas (1). As lesões nervosas constituem um caso clínico comum, com alta prevalência e incidência mundial, afetando cerca de 18 indivíduos por 100.000 a cada ano (2), superando, por exemplo, a incidência de cânceres de ovário e estômago (3). Embora essas lesões estejam frequentemente associadas a traumas como acidentes de veículos ou com armas perfurocortantes, também é grande o número de lesões iatrogênicas, isto é, erro médico, durante cirurgias emergenciais ou eletivas (4). Estudos epidemiológicos realizados ao redor do mundo (3-6) apontam uma maior propensão de jovens do sexo masculino, sendo as lesões de nervos no carpo ou membros inferiores as mais prevalentes, seguidas por lesões no braço. Muitos indivíduos acometidos por lesões nervosas, tanto em casos graves quanto moderados, apresentam recuperação incompleta, resultando em perdas transitórias ou permanentes das funções motoras e sensoriais, além de apresentarem dor crônica, atrofia muscular e fraqueza. Aproximadamente um terço de todas as lesões nervosas demonstram recuperação incompleta com má restauração da função (7).

Os nervos são estruturas formadas por feixes de fibras nervosas que fazem parte do sistema nervoso periférico e podem ser classificados de acordo com sua origem em cranianos ou espinais. Os nervos espinais são aqueles conectados à medula espinal, tendo sua origem real no gânglio da raiz dorsal e na coluna anterior de substância cinzenta da medula espinal. Os nervos consistem em feixes de axônios, que são prolongamentos longos e delgados de neurônios que alcançam uma estrutura alvo, que determina o tipo de inervação como sensitiva ou motora. Os nervos sensitivos são formados por fibras aferentes, responsáveis por levar informações do meio ambiente e do interior do corpo para os centros nervosos. Os nervos motores apresentam fibras eferentes, que conduzem informações dos centros nervosos para os órgãos efetores. Já os nervos mistos, sendo estes a grande maioria dos nervos presentes no corpo humano, já que todo nervo espinal é misto, possuem tanto fibras eferentes quanto aferentes. Assim, estabelece-se uma via de comunicação mútua entre o sistema nervoso central e as áreas periféricas do corpo (1), como por exemplo no nervo isquiático, o maior nervo do corpo, que tem origem na porção lombar da

medula espinal e se ramifica nos nervos tibial, fibular e sural, sendo responsável pela maior parte da inervação sensitiva e motora do membro pélvico.

A conexão entre o neurônio motor e as fibras musculares, se dá através dos axônios. O conjunto de axônios formam o nervo. Cada nervo é composto por uma camada externa de tecido conjuntivo denso, conhecida como epineuro, que reveste o nervo e preenche os espaços entre os feixes de fibras nervosas, proporcionando resistência e rigidez à estrutura. Cada feixe contém vários fascículos nervosos e é revestido por uma bainha externa de tecido conjuntivo e uma camada interna de células achatadas e justapostas, o perineuro. As células da bainha perineural se unem por meio de junções oclusivas, formando uma barreira à passagem de muitas macromoléculas, o que representa um importante mecanismo de defesa contra agentes agressivos. Essas células são permeadas por pequenos vasos sanguíneos, conhecidos como *vasa nervorum*, que irrigam o interior do tecido nervoso. Dentro de cada fascículo, encontram-se axônios, cada um envolvido pela bainha de células de Schwann (bainha de mielina), com sua lâmina basal e um envoltório conjuntivo composto principalmente por fibras reticulares sintetizadas pelas células de Schwann, chamado endoneuro (8-10).

Os neurônios motores somáticos são células nervosas especializadas, com arborização dendrítica altamente desenvolvida, que conduzem impulsos nervosos para fora do sistema nervoso central, com a principal função de controlar os órgãos efetores, entre eles os músculos estriados esqueléticos. O neurônio, é composto por três partes: soma, o corpo celular; projeções a partir do soma, axônios e dendritos.

Os neurônios motores são multipolares, ou seja, possuem um único axônio e múltiplos dendritos. Seu corpo celular está localizado na coluna anterior da substância cinzenta da medula espinal, principalmente na lâmina 9 de Rexed, podendo ser classificados em neurônios motores alfa, beta e gama. No caso dos neurônios motores alfa, seus axônios se estendem por todo o corpo através de nervos periféricos até atingirem os órgãos-alvo (11, 12), o músculo estriado esquelético, onde forma uma região morfológica, molecular e funcionalmente especializada chamada junção neuromuscular (JNM) (Figura 1). Um neurônio motor e as fibras musculares por ele inervadas constituem uma unidade motora.

Na JNM, ocorre a transdução de um sinal elétrico (impulso nervoso) para um sinal físico-químico (neurotransmissores) do neurônio motor para a fibra muscular, promovendo a contração muscular. Esta junção apresenta uma subclasse importante de sinapse no sistema nervoso de mamíferos, crítica para realização de um movimento coordenado (11).

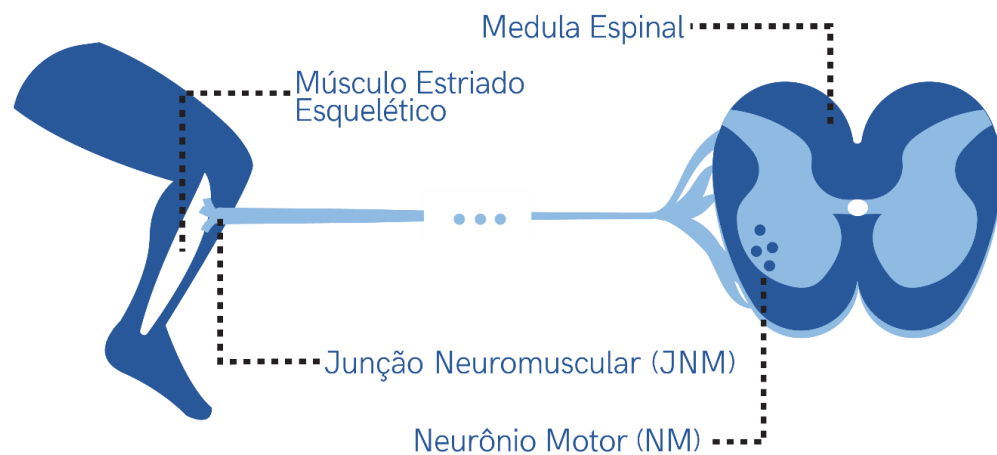


Figura 1. Esquema ilustrativo da unidade motora, sendo exemplificado estruturas relevantes para a realização de um movimento, desde o neurônio motor situado na coluna anterior da medula espinal até a junção neuromuscular no músculo estriado esquelético (8).

Além dos neurônios, o meio celular da medula espinhal também contém outra classe importante de células conhecidas como glia (13). Essas células gliais podem ser categorizadas em micróglias e macróglias, e ambas desempenham um papel central no sistema nervoso, proporcionando um ambiente otimizado para o desenvolvimento saudável e a função neuronal (13, 14).

As macróglias compreendem astrócitos e oligodendrócitos no SNC, e células de Schwann no SNP (13). Os astrócitos são células heterogêneas que desempenham um papel crítico na otimização do ambiente extracelular para a função neuronal (15, 16). Suas funções incluem regular os níveis de neurotransmissores e íons, para garantir um meio ideal para a sinalização neuronal. Além disso, os astrócitos contribuem para mudanças coordenadas no diâmetro dos vasos sanguíneos do SNC e no fluxo sanguíneo. Eles expressam altos níveis de transportadores para

neurotransmissores (como glutamato, GABA e glicina), removendo essas moléculas da fenda sináptica. Os astrócitos também são fundamentais para a formação da barreira hematoencefálica (BBB), que controla seletivamente a entrada de certas moléculas no parênquima cerebral com base na polaridade e no tamanho (13, 14, 17).

Em tecido saudável, os astrócitos exibem elevações transitórias de cálcio intracelular, representando uma forma de excitabilidade. Essas flutuações de cálcio estão envolvidas em funções astrocíticas dinâmicas críticas, incluindo interações com sinapses e regulação do fluxo sanguíneo. Além disso, os astrócitos respondem a todas as formas de injúria ao SNC através de um processo denominado astrogliosis reativa, que se tornou uma característica patológica de lesões estruturais no SNC (15, 16) na qual a dinâmica do Ca^{2+} dos astrócitos e as respostas da rede tornam-se aberrantes, alterando assim as funções sinápticas e o comportamento, resultando na perda de suporte trófico ou antioxidante dos astrócitos (18).

Por outro lado, como células inflamatórias residentes no sistema nervoso central, as micróglia exibem um fenótipo de vigilância, no qual detectam diversos sinais extracelulares, e também os integram e respondem a eles para manter a homeostase do SNC (13, 14, 19). As micróglia residentes também desempenham um papel central na regulação da homeostase vascular e na angiogênese, sugerindo que podem representar uma fonte alternativa de fatores de crescimento pró-angiogênicos e citocinas (20). Em condições normais, elas fornecem efeitos protetores e moduladores liberando fatores tróficos de sobrevivência e removendo células mortas e removendo sinapses em excesso. No entanto, quando ativadas em condições patológicas, elas sofrem mudanças morfológicas e funcionais complexas, tendo um papel central na lesão do SNC e na progressão da doença ao liberar mediadores inflamatórios e citotóxicos (14). Em condições não inflamatórias, as micróglia têm uma morfologia altamente ramificada com longos ramos sinuosos que surgem de um pequeno corpo celular. Após a detecção de um estímulo patológico, as micróglia mudam rapidamente sua morfologia encurtando seus processos e aumentando seu corpo celular (21, 22). Essa mudança morfológica ocorre continuamente e o grau de desramificação está relacionado à gravidade do estímulo patológico (22). Assim, a interação entre motoneurônios e o microambiente circundante desempenha um papel crítico em sua sobrevivência, regulação do estado funcional e conectividade sináptica.

1.2. *Junção Neuromuscular*

As JNMs são estruturas pequenas (30-60 μm) quando comparadas ao comprimento das fibras musculares inervadas, e a maior parte das fibras musculares esqueléticas são recrutadas por uma única JNM (Figura 2-A)(23). A morfologia clássica da JNM, descrita inicialmente em roedores, é caracterizada por uma estrutura em forma de “pretzel”, e mudanças nessa estrutura estão intimamente associadas a patologias motoras (24). Morfologicamente as JNMs são compostas por três compartimentos celulares intimamente associados (25), sendo eles o terminal nervoso (ou membrana pré-sináptica), a fenda sináptica e a membrana pós-sináptica.

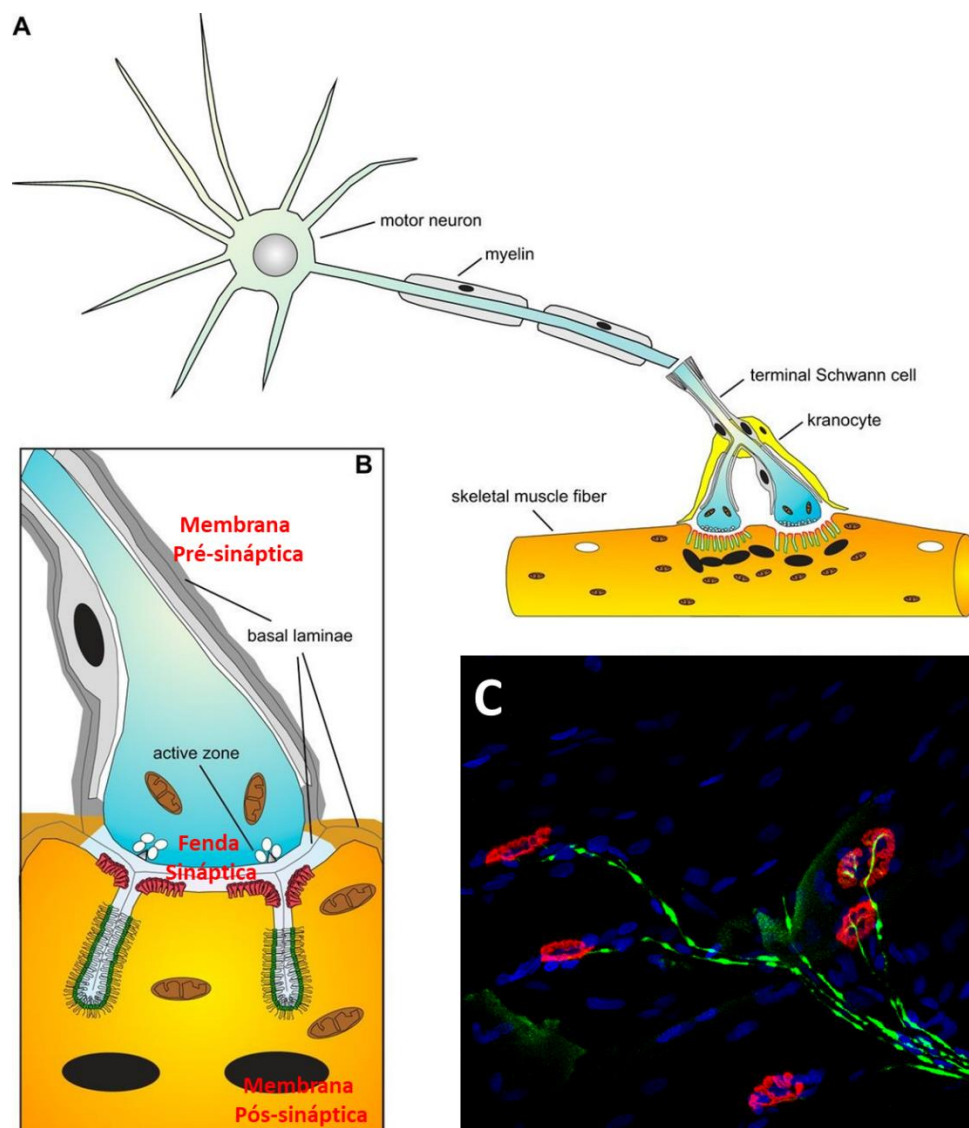


Figura 2: Organização da junção neuromuscular. A: Neurônios motores, cujos corpos celulares e dendritos estão localizados na medula espinhal, enviam seus axônios para a periferia e formam junções neuromusculares para inervar fibras musculares esqueléticas. B: Alta ampliação da junção

neuromuscular. C: Vista de montagem completa da faixa sináptica de um sóleo de rato, fotomicrografia cedida pela autora Selma Matheus. Axônios motores são rotulados com anticorpos para a proteína NF200 (Neurofilamento-200; verde), núcleos inespecíficos são vistos em azul pela marcação com DAPI, e nAChRs pós-sinápticos são visualizados por α -BTX (vermelho). Imagem adaptada de (24).

Na membrana pré-sináptica (Figura 2-B), os ramos terminais dos axônios dos neurônios motores inferiores formam botões sinápticos que, no caso de mamíferos, abrigam vesículas sinápticas contendo o neurotransmissor acetilcolina (ACh). Este terminal nervoso possui vários componentes celulares, incluindo mitocôndrias, retículo endoplasmático, endossomos de reciclagem, substâncias orgânicas e íons metálicos (26, 27). Uma grande quantidade de vesículas sinápticas e células de Schwann terminais ou peri-sinápticas (tSCs) também são encontradas nesta região (28-30); elas são células gliais não mielinizantes cujas extensões cobrem os terminais nervosos, protegendo-os de lesões químicas e mecânicas (31). Além disso, as tSCs são as principais responsáveis pela plasticidade estrutural das JNMs, detectando possíveis alterações na transmissão sináptica (32, 33). Uma a três tSCs cercam o terminal nervoso e participam ativamente do desenvolvimento, manutenção e reparo da função sináptica (23). Quando o potencial de ação do nervo motor chega ao terminal do neurônio pré-sináptico, ele abre canais de cálcio que dependem da voltagem. Isso permite que íons de Ca^{2+} entrem no citosol do neurônio pré-sináptico a partir do fluido extracelular. Esse aumento de Ca^{2+} provoca a fusão de várias centenas de vesículas cheias de neurotransmissores com a membrana celular do neurônio pré-sináptico, utilizando proteínas SNARE, liberando assim a ACh por meio da exocitose para a fenda sináptica.

A fenda sináptica separa o terminal nervoso pré-sináptico da membrana pós-sináptica, constituindo um estreito espaço de 50 a 80 nm de largura (Figura 2-B). Ela é preenchida com a lâmina basal sináptica, composta por moléculas secretadas tanto pelo terminal nervoso quanto pela fibra muscular associada (34). Esta região abriga proteínas cruciais para a estabilidade, função e manutenção da JNM, incluindo aquelas responsáveis pelo agrupamento de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) no sarcolema, como agrina, lamininas-4, 9 e 11, metaloproteinase de matriz 3 (MMP3) e colágeno IV. A acetilcolinesterase (AChE), essencial para degradar a ACh após a contração muscular, também está concentrada aqui (35, 36).

A membrana pós-sináptica (Figura 2-B) compreende a membrana plasmática da fibra muscular, sendo constituída por pregas e o sarcoplasma da fibra muscular (citoplasma) (29, 30). Essas pregas exibem duas regiões distintas: o ápice, que contém os nAChRs e proteínas adicionais como rapsina, utrofina e α -distrobrevina-1; e o fundo, que abriga α -distrobrevina-2, distrofina e moléculas de adesão neurais. Além disso, canais de sódio dependentes de voltagem, responsáveis pela geração de potenciais de ação, também estão presentes nesse local (24, 37, 38). As dobras do sarcolema amplificam a área de superfície da membrana pós-sináptica e facilitam a justaposição dos nAChRs com as áreas pré-sinápticas, enquanto os canais de sódio se estendem dentro do sarcoplasma. A lâmina basal, que envolve componentes da matriz extracelular, envolve firmemente as fibras musculares, conectando-se com a lâmina basal da fenda sináptica produzida pelas tSCs na periferia da JNM (24).

Na JNM, os nAChRs (Figura 2-C) são os principais responsáveis pela comunicação motora neuromuscular (39), facilitando a transmissão sináptica. Estruturalmente, eles são compostos por cinco subunidades dispostas em um padrão de roseta, formando canais iônicos (40). Esses receptores existem em duas formas: extrajuncionais imaturos, presentes em fibras musculares embrionárias e desnervadas, sendo compostos pelas subunidades duas alfas [α], beta [β], delta [δ] e gama [γ]; e as formas juncionais maduras, onde as subunidades α [2], β e δ são mantidas, e a subunidade γ é substituída pela epsilon [ϵ] (27).

A ativação dos nAChRs é iniciada pela ligação simultânea de duas moléculas de ACh às subunidades $\alpha\delta$ e $\alpha\epsilon$, induzindo uma alteração conformacional que abre o poro iônico e ativa o receptor (41, 42). A duração desse estado ativo é modulada pela interação entre o receptor e as moléculas de ACh, que são rapidamente degradadas pela acetilcolinesterase (AChE), retornando os nAChRs à sua configuração inativa (42). Em casos de lesão ou patologia, os nAChRs frequentemente retornam a um padrão embrionário, apresentando a subunidade γ em vez de ϵ (43). Essa troca de subunidades contribui para várias mudanças nas propriedades de estabilidade, cinética e transmissão (11). Existem sinais positivos e negativos envolvidos na manutenção da JNM e nos agrupamentos de nAChRs (23). O principal sinal positivo é a ligação que ocorre na via Agrina/LRP4/Musk/Rapsina (44), que está diretamente relacionada com a formação, agregação e manutenção funcional dos nAChRs.

A Agrina, uma glicoproteína liberada pelos axônios motores, se liga ao receptor LRP4 na membrana muscular. Esta ligação ativa a quinase específica do músculo (MuSK), que inicia uma cascata de sinalização intracelular. A ativação de MuSK resulta na fosforilação de várias proteínas, promovendo o agrupamento dos nAChRs na membrana pós-sináptica. A Rapsina, uma proteína associada aos nAChRs, é fundamental para ancorar e estabilizar esses receptores na membrana, garantindo a formação de sinapses funcionais (23, 29, 45).

A importância desta via é evidenciada por estudos que mostram que mutações ou disfunções em qualquer um dos componentes levam a falhas na formação das JNMs, resultando em doenças neuromusculares como a miastenia gravis (23, 24). Além disso, a via Agrina/LRP4/MuSK/Rapsina é essencial não apenas para a formação inicial das JNMs, mas também para sua manutenção e reparo ao longo da vida, adaptando-se a mudanças e lesões, configurando uma estrutura extremamente plástica e adaptativa (31, 46).

1.3. *Lesões nervosas*

As lesões nervosas são categorizadas em vários graus, baseados na severidade da lesão do tecido nervoso (1). Essas categorizações auxiliam profissionais da saúde e pesquisadores a entenderem melhor a fisiopatologia das lesões nervosas e a estabelecerem o tratamento mais adequado. Isso ocorre porque essas classificações possibilitam uma correlação entre as mudanças microscópicas observadas no nervo e os sintomas apresentados pelo paciente.

A primeira classificação clássica foi proposta por Sir Herbert Seddon, que estabeleceu uma classificação para as lesões em três níveis (47). Essa classificação foi baseada na existência de desmielinização e no grau de dano aos axônios e aos envoltórios conjuntivos do nervo. Em seguida, Sir Sydney Sunderland expandiu a classificação de Seddon, adicionando uma subdivisão, que foi baseada na descontinuidade das diversas camadas dos envoltórios conjuntivos no nervo (48) (Figura 3).

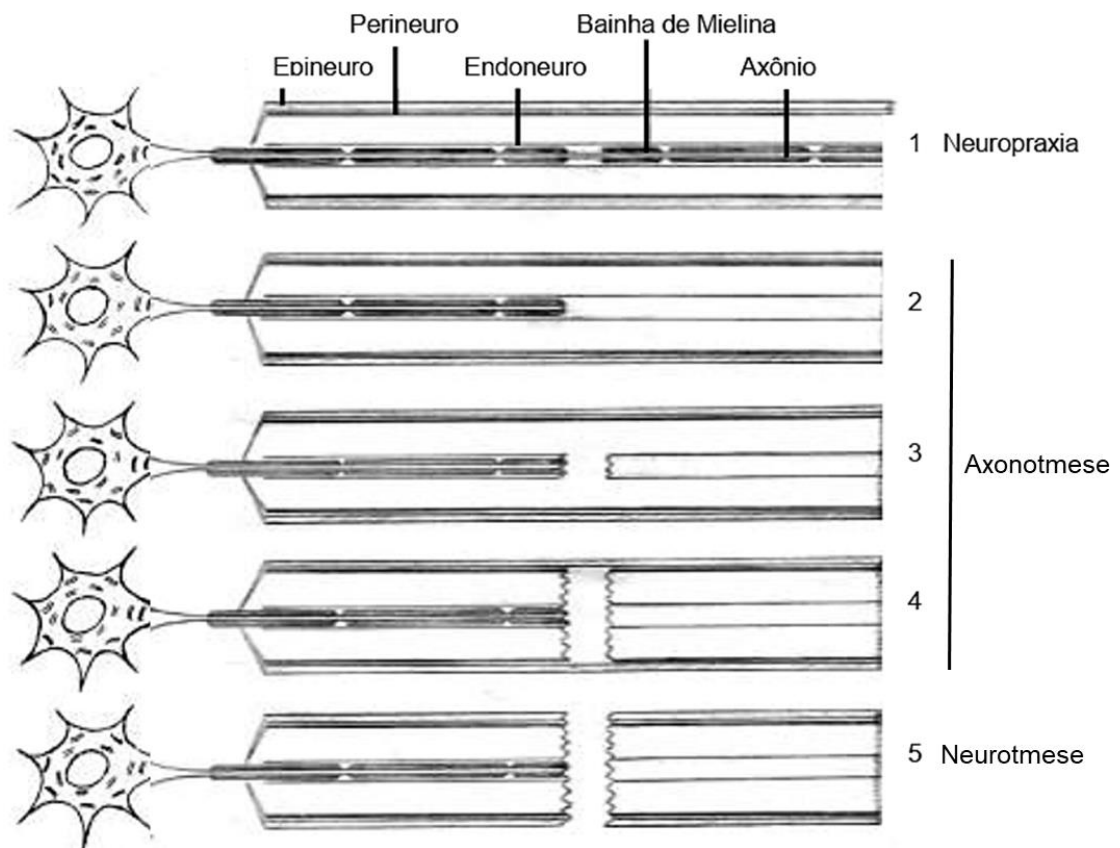


Figura 3. Classificação das lesões nervosas proposta por Sunderland. Adaptado de (49).

A classificação de Seddon categoriza as lesões nervosas em três graus distintos: neuropraxia (Figura 3-1), axonotmese (Figura 3-2) e neurotmese (Figura 3-5). A neuropraxia é considerada a forma mais branda, caracterizada pela perda da bainha de mielina, mas sem danos ou ruptura do tecido nervoso, de maneira que não há descontinuidade axonal, resultando apenas em uma interrupção temporária da transmissão do impulso nervoso (47). Neste caso, há uma perda funcional transitória e que normalmente apresenta recuperação rápida e completa sem necessidade de intervenção (1).

Já a axonotmese é considerada um tipo intermediário de lesão. Nela o tecido nervoso é danificado, embora haja preservação parcial dos envoltórios conectivos (epineuro, perineuro e endoneuro) que protegem o nervo e não há ruptura da continuidade axonal (47). Nestes casos a recuperação funcional depende do crescimento axonal, e ocorre mais comumente associada às lesões por esmagamento e fraturas ósseas. Dado que os envoltórios de tecido conjuntivo permanecem preservados, a perspectiva de recuperação é positiva, no entanto, a recuperação total é menos provável do que na neuropraxia (1).

O terceiro grau, ou neurotmeze, é a forma mais grave, em que ocorre um dano generalizado com transecção completa de todas as camadas nervosas, dessa forma afetando a bainha de mielina, os envoltórios conectivos e os axônios (47). Neste último caso, uma intervenção cirúrgica é necessária para possibilitar regeneração e recuperação motora após a lesão (1).

Em seguida, a classificação proposta por Sunderland (48) expandiu a classificação de proposta por Seddon, a fim de distinguir a dimensão do dano nos envoltórios conjuntivos, ressaltando principalmente os diferentes graus possíveis em casos de axonotmeze, assim descrevendo cinco possíveis estágios para a lesão nervosa (1). O primeiro estágio corresponde à neuropraxia de Seddon (Figura 3-1). Os estágios 2, 3 e 4 podem ser comparados à axonotmeze, com variações no grau de lesão (Figura 3-2 a 4). No estágio 2, a lesão ocorre a nível de bainha de mielina e axônios, mas sem descontinuidade dos envoltórios conjuntivos, de maneira que há desnervação dos órgãos-alvo e distúrbio das funções sensoriais e motoras, mas sem necessidade de qualquer intervenção cirúrgica. A recuperação funcional acontece de maneira espontânea, embora possa levar de semanas a meses, dado que a regeneração axonal é essencial. No estágio 3, a lesão se estende à bainha, aos axônios e ao endoneuro, de maneira que a recuperação autônoma se torna mais desafiadora. No estágio 4, a lesão também atinge o perineuro, de maneira que há continuidade apenas do epineuro, configurando um dano bastante severo, comumente ocasionado por esmagamentos. O estágio 5, o mais grave, é equivalente à neurotmeze de Seddon (Figura 3-5), em que há uma ruptura de todas as camadas nervosas (48).

Na transecção completa do nervo, ou neurotmeze, todas as estruturas do aparato neuromuscular são prejudicadas, desde as JNMs e as fibras musculares até o corpo celular do neurônio motor na medula espinal, devido ao bloqueio da condução nervosa. Ao contrário do sistema nervoso central, o sistema nervoso periférico apresenta capacidade de regeneração e reinervação, sendo que os axônios lesionados se regeneram lentamente a uma taxa de 1 a 4 mm/dia (50). No entanto, diversos fatores dificultam essa regeneração após a lesão, incluindo a severidade, o mecanismo de lesão, a grande distância entre o corpo celular do neurônio e o tecido alvo e a perda do suporte das células de Schwann, de modo que a recuperação funcional total normalmente não é alcançada (51, 52).

1.4. Patofisiologia da lesão nervosa

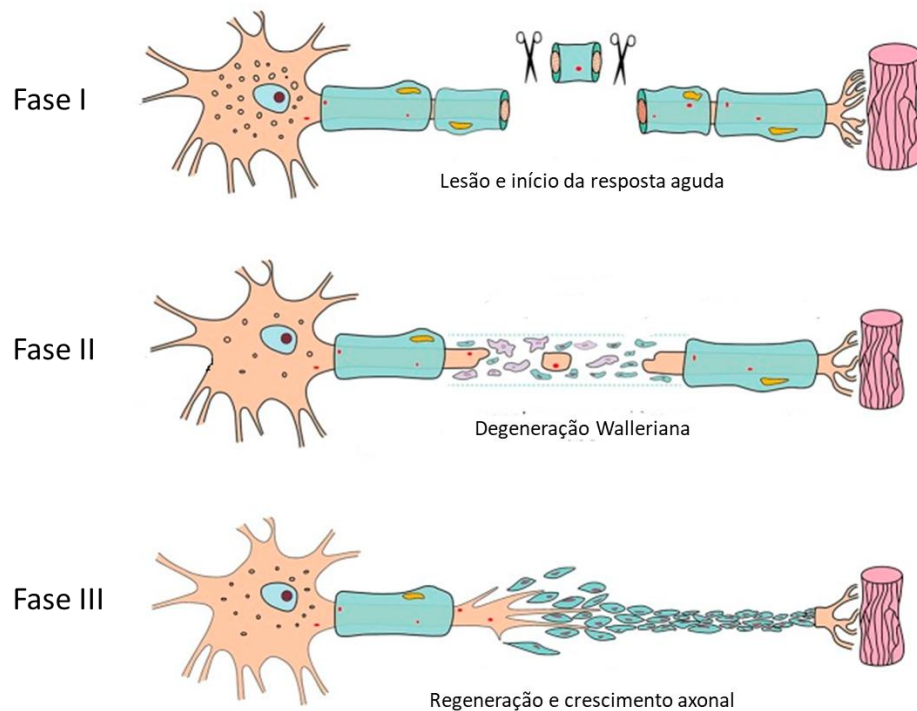


Figura 4. Representação esquemática das mudanças desencadeadas pela lesão de nervo. Adaptado de (53).

Após a lesão nervosa, uma cascata de respostas fisiológicas e metabólicas é desencadeada no nível celular no local da lesão e no corpo celular dos neurônios afetados, na tentativa de se restabelecer o dano resultante da lesão (23) (Figura 4 - Fase I). Na neurotmeze, o nervo é segmentado em dois cotos, distal e proximal ao local da lesão, que estão sujeitos a processos relativamente distintos (54). O coto proximal se mantém ligado ao corpo celular na medula e adota um perfil regenerativo, enquanto que o órgão alvo e o coto distal são privados de sua fonte de estímulo elétrico e passam por alterações degenerativas seguidas por um processo de regeneração após inervação.

No coto distal, em que os axônios perdem contato com os corpos neuronais, rapidamente tem início o processo da degeneração Walleriana, manifestando-se como quebra da mielina e desintegração axonal (Figura 4 - Fase II). Esse processo inicia-se com um influxo de cálcio intracelular, desencadeando a ativação e

granulação de proteases dentro do axoplasma através da proteólise de microtúbulos e neurofilamentos. Essa sucessão de eventos compromete ainda mais a integridade organizacional da estrutura celular (54, 55). Nesse meio, padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e agentes pró-inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral (TNF-) α , interleucina (IL-) 1 β e CCL2, ativam a resposta imune inicial, principalmente atribuída a macrófagos (56). Uma das principais funções desses macrófagos é a depuração de resíduos teciduais, papel reforçado pelas células de Schwann através da autofagia da mielina (57). As células de Schwann, fibroblastos e macrófagos residentes também contribuem para o meio inflamatório, liberando mediadores pró-inflamatórios (58).

Dentro da depuração tecidual, a regeneração começa lentamente na extremidade proximal do local da lesão e prossegue em direção ao segmento distal (Figura 4 - Fase III). Nesse contexto, as células de Schwann próximas à região lesada se desdiferenciam, proliferam e migram para o local da lesão. Lá, elas se alinham dentro dos tubos endoneurais, formando colunas longitudinais conhecidas como bandas de Büngner, dentro das quais liberam fatores de crescimento e fatores tróficos para estimular o alongamento axonal até o órgão previamente inervado (52). É importante ressaltar que a orientação correta das bandas de Büngner é dependente de uma vasculatura polarizada, induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular derivado de macrófagos ao estímulo da hipóxia. Esses vasos sanguíneos recém-formados são essenciais para a regeneração guiando a migração das células de Schwann através da ferida e subsequente alongamento axonal (59).

Dentre as proteínas constituintes do citoesqueleto axonal, as mais comumente estudadas são os neurofilamentos, cuja principal função é assegurar a integridade mecânica dos axônios (60). Em quadros de lesão no sistema nervoso, ocorre a interrupção da organização e/ou expressão dos neurofilamentos, desse modo o aumento dessas estruturas está relacionado a maturidade do tecido e melhora na recuperação pós lesão. Estudos utilizando como modelo a lesão nervosa em diferentes intervalos de tempo comprovaram que há associação do aumento de neurofilamentos à melhora do desempenho funcional (61-64). Durante o processo de regeneração, as células de Schwann expressam proteínas essenciais como a S100 (65, 66) e mielinizam os axônios de médio a grande calibre, assegurando a transmissão adequada do impulso nervoso.

No coto proximal, a neurotmease evoca uma resposta retrógrada nos corpos celulares neuronais (10), havendo mudanças estruturais e alterações em seu perfil de expressão gênica adotando uma função regenerativa ao invés de sináptica/de transmissão (52). Os neurônios sobreviventes sofrem uma série de alterações fisiológicas e morfológicas denominada cromatólise, caracterizada pelo inchaço e arredondamento do corpo celular, dissolução dos grânulos de Nissl, deslocamento excêntrico do núcleo e retículo endoplasmático e desorganização das organelas (1, 67). Essas modificações estruturais são paralelas a uma mudança no metabolismo celular fisiológico em direção à síntese de proteínas envolvidas na regeneração axonal (10), como aqueles relacionados ao citoesqueleto e fatores de crescimento (54). Com a eliminação dos resíduos de mielina, a regeneração começa lentamente na extremidade proximal do local da lesão e prossegue em direção ao segmento distal. Os axônios seccionados produzem um grande número de brotos, intimamente associados às células de Schwann, formando vários cones de crescimento com axônios de pequeno calibre que crescem gradativamente ao longo da deposição da bainha de mielina.

De maneira coordenada, as células gliais ativadas proliferam significativamente após a lesão, sendo um processo que persiste de dois dias a vários meses após a axotomia (68). A ativação astrogliar e microgliar após a axotomia parece desempenhar um papel crucial na retração sináptica dos corpos celulares dos motoneurônios em que realizam alterações sinápticas retrógradas conhecidas como "*synaptic stripping*", um processo pelo qual a micróglia residente seletivamente remove sinapses de neurônios lesionados (69). Nesse processo há o extenso descolamento de terminais pré-sinápticos de perfis neuronais e dendritos de motoneurônios axotomizados (70), pela ação da glia residente. Esse estímulo rapidamente recruta maiores números de astrócitos e micróglia nas proximidades dos terminais sinápticos afetados que, em seu modo regenerativo, reagem através de mudanças conformacionais e estruturais de suas projeções citoplasmáticas se contactando com a membrana do motoneurônio lesionado e os terminais sinápticos degenerados (71), em especial, aqueles de origem glutamatérgicas (72), que podem ser identificados através de marcações dos transportadores vesiculares de glutamato 1 ou 2 (VGLUT-1/2).

Nesse cenário, a distância da lesão do corpo celular implica piora do quadro regenerativo, como observado em neurônios sensoriais, onde a maior proximidade

com os gânglios da raiz dorsal está diretamente relacionada ao número de células nervosas mortas (73) e uma maior distância efetiva para a regeneração. Outro desafio importante é o emparelhamento equivocado dos axônios em regeneração, que podem se conectar com outros fascículos nervosos, direcionando-os para outros músculos ou outros tecidos (72). Esses erros alteram a conectividade original dos motoneurônios, levando a deficiências funcionais motoras. Surpreendentemente, embora os axônios se regenerem, estudos têm demonstrado que a recuperação morfológica do nervo e do músculo não é suficiente para promover a recuperação funcional, pois ainda pode haver comprometimento da funcionalidade sináptica (74, 75).

As lesões nervosas também afetam diretamente o sistema muscular, causando prejuízo aos músculos inervados que perdem sua fonte de estímulo elétrico. São observadas diversas alterações morfológicas e moleculares, geralmente associadas à atrofia muscular, com redução da área das fibras, do número de mionúcleos e células satélites (76); desorganização extracelular dos sarcômeros e intracelular de suas organelas, com dano mitocondrial e vacuolização; e alteração na expressão de proteínas relacionadas à degeneração, inflamação e atrofia muscular (44, 77). Ainda que haja uma alta plasticidade neuromuscular após lesão e reinervação, o processo autônomo é insuficiente para recuperação dos movimentos finos, visto que atrasos na reinervação muscular ainda comprometem também a capacidade regenerativa dos motoneurônios afetados e há um desvio considerável da direção das fibras nervosas em regeneração (54).

Por fim, as terminações nervosas que formaram as JNMs também são perdidas e, mesmo com o brotamento axonal bem-sucedido, a falha da reinervação limita a recuperação da função muscular (78) (Figura 5A). Alguns fatores como o brotamento de um ramo irregular do nervo, poli-inervação (79) e, o mais comum, reinervação colateral das fibras musculares são obstáculos para uma recuperação funcional satisfatória. As JNMs desnervadas sofrem degeneração grave e subsequente desintegração (80) e desagregação dos nAChRs e das proteínas ancoradas, fundamentais para a manutenção de sua função (81). Os DAMPs dos axônios lesionados ativam as células de Schwann terminais (tSCs), as quais mantêm contato íntimo com a porção do terminal nervoso das JNMs, e liberam quimiocinas, sinalizando como substratos de orientação para pontes de tSCs e reinervação da JNM (11, 82) .

A subunidade nAChR- ϵ é substituída pela nAChR- γ levando à falha na ativação sináptica, além de falência muscular e atrofia (83).

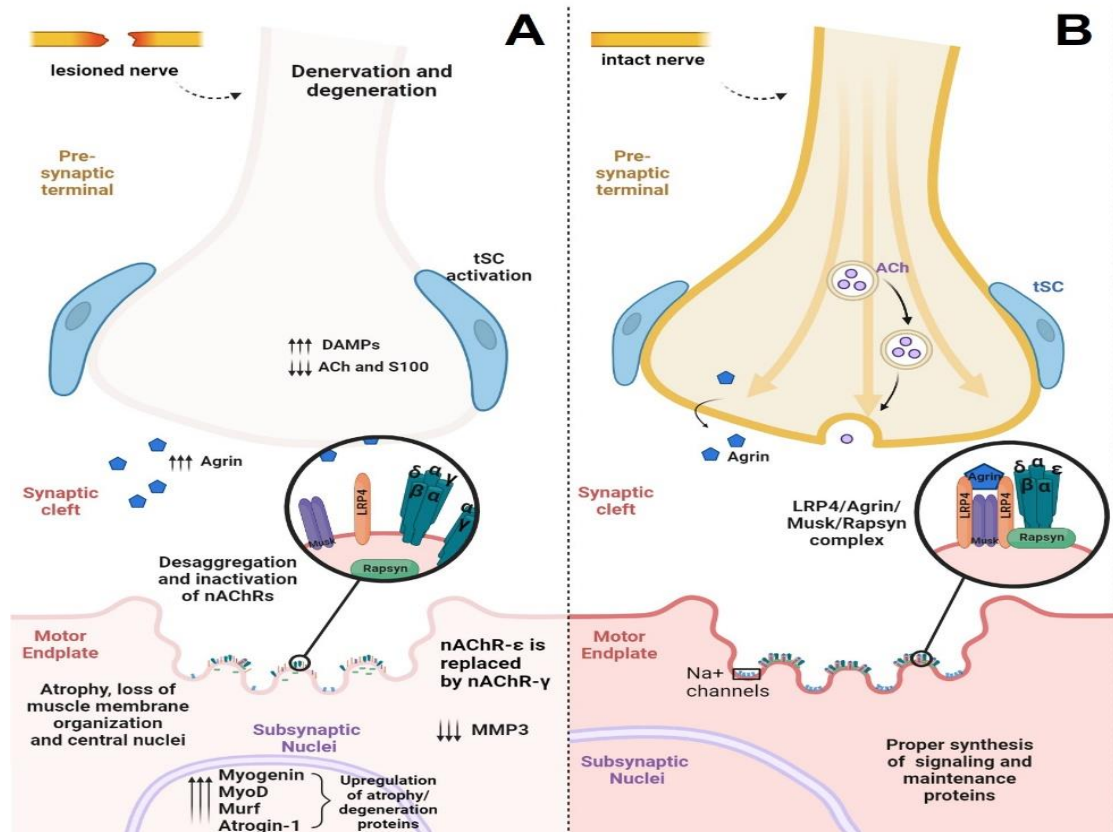


Figura 5. Eventos celulares e moleculares associados à desnervação e reparo muscular ao nível da junção neuromuscular. Esquema de junção neuromuscular desnervada (A) e saudável (B). Após a lesão nervosa, todos os componentes da JNM são prejudicados e a via de sinalização Agrina/LRP4/Musk/Rapsina desempenha um papel significativo para a formação dos novos cluster nAChRs e manutenção da JNM. Adaptado de (25).

Outro prejuízo decorrente da desnervação as JNMs é relacionado a mudanças significativas na expressão de proteínas da via da Agrina/Rapsina/Musk/LRP4, fundamental para a manutenção e estabilização dos clusters de nAChR (84), levando a alterações da área e conformação da JNM (77). Logo após a lesão, proteínas desta via têm síntese aumentada, mas sua complexa desorganização leva à falha no funcionamento adequado, inativação de MMP3 e acúmulo de Agrina na fenda sináptica (11). Devido a desorganização, o microambiente da JNM também é privado de outros sinais retrógrados e anterógrados que mantêm sua estabilidade (11), em que as tSC ativadas estendem seus processos de síntese de nAChR em regiões musculares não-sinápticas.

Para o processo regenerativo, a proteína Agrina tem um papel fundamental em iniciar a via de agrupamento de receptores, remodelando e retornando as JNMs à sua forma convencional (23). A proteína LRP4, dependente de Agrina para ativação (84), também tem papel fundamental no processo regenerativo, contribuindo para a ativação das tSCs após lesão, que são responsáveis por orientar a reinervação dos JNMs nas fibras desnervadas (77). Notavelmente, as tSCs ativas também mantêm a organização dos JNMs secretando substratos que regulam proteínas pós-sinápticas, como a MMP3, que está envolvida na integridade da lâmina basal e da placa terminal (80, 85). Outras proteínas sintetizadas pelo músculo também desempenham um papel fundamental na manutenção e regeneração pós-sináptica, já que são participantes de vias de regulação importantes, como as proteínas MusK e Dok7 da via da Agrina ou MURF-1 e atrogina-1 da via da ubiquitina-proteassoma, que previnem a desnervação (11, 77). Ademais, o retorno da subunidade épsilon substituindo a subunidade gama é um indicador de regeneração, pois ocorre somente após a reinervação e diferenciação dos miotubos (11).

Em conjunto, grandes eventos celulares e moleculares ocorrem e privam não só o nervo associado, as células de Schwann e as fibras musculares, mas também a JNM, provocando uma série de sinais que, mesmo com a regeneração morfológica dos axônios, podem não resultar em associação definitiva com a recuperação funcional. A compreensão do nicho terapêutico da JNM é essencial para proporcionar resultados positivos após a reinervação, o que inclui não apenas a reinervação através da chegada de axônios regenerados aos domínios musculares pós-sinápticos desnervados, mas também a capacidade de ativação sináptica (Figura 5B). Estudos indicam que somente a partir de 12 semanas após reconstrução nervosa com neurorrafia isolada, que as placas motoras estão completamente reinervadas, com retorno da morfologia das JNMs aos padrões normais (74, 86). Surpreendentemente, estudos em roedores (74, 75) demonstraram que existe um período crítico após o qual, mesmo com 4 meses após reparo, reinervação do músculo-alvo e formação das JNMs, não há resultado motor satisfatório, o que pode refletir em um possível defeito na transmissão sináptica. Isto sugere que o reparo por neurorrafia (sutura) isolada é insuficiente para restauração funcional das JNMs (75).

1.5. *Abordagens de reparo após lesão*

Nos últimos anos, várias abordagens têm sido testadas e utilizadas com o objetivo de aperfeiçoar a funcionalidade do nervo lesionado (87, 88). A maioria dos modelos experimentais utiliza roedores, em que são cirurgicamente realizadas lesões nos nervos facial, ulnar ou isquiático (89). Tratamentos que resultam em completa recuperação morfológica e funcional permanecem um desafio para a prática médico-cirúrgica. As principais dificuldades estão relacionadas à própria reconexão e regeneração nervosa, em que os axônios regenerados não conseguem atingir seus tubos endoneurais originais (54), além disso há dificuldade na revascularização local, perda progressiva do caráter regenerativo nas células de Schwann, atrofia dos órgãos inervados. Além disso o tempo prolongado entre a intervenção médica após a lesão são fatores cruciais que interferem na recuperação (9, 54, 60, 90).

Dentre as técnicas de correção para transecção nervosa, a neurorrafia término-terminal é o padrão-ouro (39). Esse tipo de neurorrafia só é possível quando os cotos nervosos estão preservados, visíveis e íntegros, sem perda tecidual, e não há tensão para reaproximação e reconexão dos cotos (91). Apesar dos avanços nas técnicas de reparo microcirúrgico, a recuperação funcional satisfatória das estruturas acometidas ainda não foi alcançada, pois mesmo com o sucesso da reconexão entre os cotos nervosos, as taxas de recuperação motora tardia atingem apenas 50% de sucesso (92). Desse modo, a investigação e desenvolvimento de novas estratégias e abordagens que visem uma melhor regeneração são necessários. Diversos estudos têm investigado a associação de terapias adjuntas à neurorrafia, como a utilização de enxertos nervosos, tubos conduítes, terapias celular, fotobiomodulação e aplicação de selantes de fibrina (1, 2, 7).

Os selantes de fibrina são substâncias adesivas que mimetizam os estágios finais da coagulação sanguínea, através da formação de um coágulo de fibrina estável e fisiológico no local de aplicação. Eles ainda fornecem um suporte físico para a matriz extracelular e podem ser associados a outros compostos de tratamento, já que possuem a capacidade de preservar os fatores bioquímicos e as propriedades originais dos implantes. (93-96). Dessa maneira, os selantes são muito úteis para proporcionar hemostase, permitir a redução no número de suturas e proteger o ambiente contra infecções por microrganismos (95, 97). Eles também permitem diminuição das reações inflamatórias e da incidência de trauma (1, 98),

proporcionando uma agilidade na cirurgia e na recuperação, devido à facilidade e rapidez de aplicação.

Em linhas gerais, os selantes de fibrina são produzidos de duas formas: a partir de derivados sanguíneos autólogos ou homólogos. Os selantes autólogos utilizam o sangue do próprio paciente, de maneira que são biocompatíveis e não apresentam risco de transmissão de doenças infecciosas, mas não são viáveis em cirurgias e aplicações de emergência. Como alternativa, selantes homólogos de fibrina produzidos por um pool de sangue humano têm sido utilizados. No entanto, nesses casos há riscos de transmissão de doenças infecciosas como hepatite, HIV e parvovirose humana (99). Além de ter um alto custo de matérias-primas, dado a necessidade de extração sanguínea de trombina bovina ou humana e fibrinogênio humano. Devido à sua composição com sangue humano, outro problema comum é a fibrinólise rápida, que se inicia em menos de 24 horas após a aplicação e desprende prematuramente os cotos nervosos (99).

Mesmo com sua introdução não tão recente na clínica humana, ainda não há consenso sobre o uso e a eficácia dos selantes de fibrina para reparo nervoso, com predomínio na literatura de estudos com modelos de roedores e poucas avaliações em humanos (98, 100). O uso de selantes ainda não é aprovado por agências reguladoras, como a Anvisa e Food and Drug Administration (americana) para reparo de nervos, mas o interesse nesta terapia, não só para reconstrução nervosa, é crescente. Até hoje, os selantes de fibrina disponíveis comercialmente são produzidos a partir de trombina bovina e humana e fibrinogênio (homólogo) e apresentam desvantagens e riscos, de modo que, além de transmissores de doenças infecciosas, podem gerar fibrose, toxicidade e necrose (1). Também podem levar ao desenvolvimento de anticorpos contra trombina bovina, reação anafilática a proteínas bovinas, entre outras reações adversas (101, 102).

1.6. Biopolímero Heterólogo de Fibrina

Considerando as desvantagens presentes nos selantes de fibrina comercialmente disponíveis, um grupo de pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, desenvolveu e padronizou um novo selante de fibrina na

década de 1990. O biopolímero heterólogo de fibrina (BHF) consiste em dois componentes principais, sendo eles uma enzima semelhante à trombina (serina protease) extraída do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* e um crioprecipitado rico em fibrinogênio e outros fatores coagulantes obtido do sangue do búfalo *Bubalus bubalis* (95, 102). Quando ambos os componentes são misturados na presença do diluente de cloreto de cálcio, o produto polimeriza-se, formando uma robusta rede de fibrina. O BHF é um fármaco inteiramente brasileiro que tem atividade comparável aos selantes comerciais, ainda sendo biodegradável, absorvível e sem sinais de toxicidade ou reação adversa (103). Devido à sua composição única e ausência de sangue humano, é considerado o único biopolímero heterólogo de fibrina no mundo (100). Além disso, possui excelente capacidade adesiva e hemostática (95).

Comparado a outros selantes comerciais de fibrina utilizados clinicamente, apresenta outras vantagens devido ao seu baixo custo de produção, alta disponibilidade de matéria-prima para sua fabricação e possibilidade de adaptar sua formulação de acordo com o tipo de procedimento (102). Sua formulação permite sua utilização em pronta entrega na clínica médica e em diversos procedimentos cirúrgicos, como enxertos de pele e reconstruções cirúrgicas, auxiliando na hemostasia e reforço de sutura (91, 99). Além disso, sua capacidade regenerativa foi testada em 40 pacientes de um ensaio clínico de fase I/II para o tratamento de úlceras venosas crônicas, demonstrando ser um produto seguro, não imunogênico e com eficácia promissora, já que houve melhora significativa da qualidade do leito da úlcera, redução significativa da área da úlcera e cicatrização em vários pacientes (104, 105).

Nos últimos anos, o BHF tem sido utilizado em associação com sutura e outros fatores terapêuticos, a fim de potencializar ou minimizar as dificuldades do tratamento padrão-ouro atual para lesões nervosas. Em associação a neurorrafia para reparo de uma transecção nervosa, a aplicação do BHF demonstrou resultados positivos na redução do trauma mecânico do nervo (redução do número de pontos de sutura) (106), demonstrou resultados morfológicos e/ou moleculares semelhante a sutura tradicional (44, 101, 106, 107), apresentou fácil utilização com boa capacidade adesiva (108); ainda proporcionou biocompatibilidade com outros materiais, principalmente terapias celulares, em que garantiu melhor sobrevivência das células e efetividade de suas funções (65, 66, 109).

Nosso grupo de pesquisa tem realizado diversos estudos investigando os efeitos regenerativos do BHF na reparação de lesões nervosas em ratos em diferentes tempos de reparo e situações de tratamento. De fato, foram observados muitos efeitos positivos associados ao potencial do BHF desde períodos iniciais após lesão, durante o pico de efeito pró-inflamatório, até períodos intermediários com um microambiente mais estabilizado (44, 77, 106, 107). Ressalta-se que a associação do BHF à neurorrafia resultou em melhorias significativas na regeneração nervosa, incluindo aumento do crescimento axonal, melhora no recrutamento da resposta imune e da vascularização tecidual, mais similaridade morfológica entre os tipos celulares observados e restauração e ancoramento das JNMs. Em uma perspectiva funcional, embora ainda não satisfatório, a combinação de BHF com sutura também já promoveu uma restauração mais eficaz do impulso nervoso, marcha e função motora. Esses resultados são promissores para o avanço do conhecimento na área de regeneração nervosa.

5. References

1. Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Qasim M, Zafar S, et al. Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery. *Int J Biol Sci.* 2020;16(1):116-34. Epub 20200101. doi: 10.7150/ijbs.35653. PubMed PMID: 31892850; PubMed Central PMCID: PMC6930373.
2. Jones S, Eisenberg HM, Jia X. Advances and Future Applications of Augmented Peripheral Nerve Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9). Epub 20160907. doi: 10.3390/ijms17091494. PubMed PMID: 27618010; PubMed Central PMCID: PMC5037771.

3. Murphy RNA, de Schoulepnikoff C, Chen JHC, Columb MO, Bedford J, Wong JK, et al. The incidence and management of peripheral nerve injury in England (2005-2020). *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2023;80:75-85. Epub 20230216. doi: 10.1016/j.bjps.2023.02.017. PubMed PMID: 36996504.
4. Kouyoumdjian JA, Graça CR, Ferreira VFM. Peripheral nerve injuries: A retrospective survey of 1124 cases. *Neurol India*. 2017;65(3):551-5. doi: 10.4103/neuroindia.NI_987_16. PubMed PMID: 28488619.
5. Asplund M, Nilsson M, Jacobsson A, von Holst H. Incidence of traumatic peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006. *Neuroepidemiology*. 2009;32(3):217-28. Epub 20090128. doi: 10.1159/000197900. PubMed PMID: 19174611.
6. Kim SJ, Kwon YM, Ahn SM, Lee JH, Lee CH. Epidemiology of upper extremity peripheral nerve injury in South Korea, 2008 to 2018. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(48):e31655. doi: 10.1097/MD.00000000000031655. PubMed PMID: 36482555; PubMed Central PMCID: PMC9726405.
7. Wang ML, Rivlin M, Graham JG, Beredjiklian PK. Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. *Connect Tissue Res*. 2019;60(1):3-9. Epub 20180906. doi: 10.1080/03008207.2018.1489381. PubMed PMID: 30187777.
8. Carlstedt T. An overture to basic science aspects of nerve injuries. *J Hand Surg Eur Vol*. 2011;36(9):726-9. Epub 20110913. doi: 10.1177/1753193411422329. PubMed PMID: 21914690.
9. Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, Reid AJ. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;82-83:160-7. Epub 20141114. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.010. PubMed PMID: 25446133.
10. Gordon T. Nerve Regeneration: Understanding Biology and Its Influence on Return of Function After Nerve Transfers. *Hand Clin*. 2016;32(2):103-17. Epub 20160310. doi: 10.1016/j.hcl.2015.12.001. PubMed PMID: 27094884.
11. Zelada D, Bermedo-García F, Collao N, Henríquez JP. Motor function recovery: deciphering a regenerative niche at the neuromuscular synapse. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2021;96(2):752-66. Epub 20201217. doi: 10.1111/brev.12675. PubMed PMID: 33336525; PubMed Central PMCID: PMC7986695.
12. Jones RA, Harrison C, Eaton SL, Llaverro Hurtado M, Graham LC, Alkhamash L, et al. Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction. *Cell Rep*. 2017;21(9):2348-56. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.008. PubMed PMID: 29186674; PubMed Central PMCID: PMC5723673.
13. Jessen KR. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(10):1861-7. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.023. PubMed PMID: 15203098.
14. Ceprian M, Fulton D. Glial Cell AMPA Receptors in Nervous System Health, Injury and Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10). Epub 20190517. doi: 10.3390/ijms20102450. PubMed PMID: 31108947; PubMed Central PMCID: PMC6566241.
15. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, Parpura V, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol*. 2016;131(3):323-45. Epub 20151215. doi: 10.1007/s00401-015-1513-1. PubMed PMID: 26671410.
16. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35. Epub 20091210. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8. PubMed PMID: 20012068; PubMed Central PMCID: PMC2799634.
17. Feng Z, Ko CP. The role of glial cells in the formation and maintenance of the neuromuscular junction. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1132:19-28. doi: 10.1196/annals.1405.016. PubMed PMID: 18567850.
18. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*. 2021;24(3):312-25. Epub 20210215. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4. PubMed PMID: 33589835; PubMed Central PMCID: PMC8007081.
19. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med*. 2017;23(9):1018-27. doi: 10.1038/nm.4397. PubMed PMID: 28886007.
20. Brandenburg S, Müller A, Turkowski K, Radev YT, Rot S, Schmidt C, et al. Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta Neuropathol*. 2016;131(3):365-78. Epub 20151230. doi: 10.1007/s00401-015-1529-6. PubMed PMID: 26718201.

21. Savage JC, Carrier M, Tremblay M. Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. *Methods Mol Biol.* 2019;2034:13-26. doi: 10.1007/978-1-4939-9658-2_2. PubMed PMID: 31392674.
22. Green TRF, Murphy SM, Rowe RK. Comparisons of quantitative approaches for assessing microglial morphology reveal inconsistencies, ecological fallacy, and a need for standardization. *Sci Rep.* 2022;12(1):18196. Epub 20221028. doi: 10.1038/s41598-022-23091-2. PubMed PMID: 36307475; PubMed Central PMCID: PMC9616881.
23. Rodríguez Cruz PM, Cossins J, Beeson D, Vincent A. The Neuromuscular Junction in Health and Disease: Molecular Mechanisms Governing Synaptic Formation and Homeostasis. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:610964. Epub 20201203. doi: 10.3389/fnmol.2020.610964. PubMed PMID: 33343299; PubMed Central PMCID: PMC7744297.
24. Tintignac LA, Brenner HR, Rüegg MA. Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol Rev.* 2015;95(3):809-52. doi: 10.1152/physrev.00033.2014. PubMed PMID: 26109340.
25. Muller KS, Tibúrcio FC, Ferreira RS, Barraviera B, Matheus SMM. Heterologous fibrin biopolymer as an emerging approach to peripheral nerve repair: a scoping review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2024;30:e20230060. Epub 20240415. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2023-0060. PubMed PMID: 38628622; PubMed Central PMCID: PMC11019597.
26. Hughes BW, Kusner LL, Kaminski HJ. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve.* 2006;33(4):445-61. doi: 10.1002/mus.20440. PubMed PMID: 16228970.
27. Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:389-442. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.389. PubMed PMID: 10202544.
28. Nishimune H, Shigemoto K. Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease. *Neurol Clin.* 2018;36(2):231-40. doi: 10.1016/j.ncl.2018.01.009. PubMed PMID: 29655446; PubMed Central PMCID: PMC5903580.
29. Lepore E, Casola I, Dobrowolny G, Musarò A. Neuromuscular Junction as an Entity of Nerve-Muscle Communication. *Cells.* 2019;8(8). Epub 20190816. doi: 10.3390/cells8080906. PubMed PMID: 31426366; PubMed Central PMCID: PMC6721719.
30. Iyer SR, Shah SB, Lovering RM. The Neuromuscular Junction: Roles in Aging and Neuromuscular Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15). Epub 20210728. doi: 10.3390/ijms22158058. PubMed PMID: 34360831; PubMed Central PMCID: PMC8347593.
31. Bloch-Gallego E. Mechanisms controlling neuromuscular junction stability. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(6):1029-43. Epub 20141031. doi: 10.1007/s00018-014-1768-z. PubMed PMID: 25359233.
32. Sugiura Y, Lin W. Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function. *Biosci Rep.* 2011;31(5):295-302. doi: 10.1042/BSR20100107. PubMed PMID: 21517783; PubMed Central PMCID: PMC4573580.
33. Ko CP, Robitaille R. Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(10):a020503. Epub 20150820. doi: 10.1101/cshperspect.a020503. PubMed PMID: 26430218; PubMed Central PMCID: PMC4588062.
34. Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol.* 1997;139(6):1507-21. doi: 10.1083/jcb.139.6.1507. PubMed PMID: 9396756; PubMed Central PMCID: PMC2132624.
35. Patton BL. Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses. *J Neurocytol.* 2003;32(5-8):883-903. doi: 10.1023/B:NEUR.0000020630.74955.19. PubMed PMID: 15034274.
36. Engel AG. The neuromuscular junction. *Handb Clin Neurol.* 2008;91:103-48. doi: 10.1016/S0072-9752(07)01503-5. PubMed PMID: 18631841.
37. Ruff RL. Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;998:1-10. PubMed PMID: 14592857.
38. Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest.* 2006;116(11):2843-54. doi: 10.1172/JCI29894. PubMed PMID: 17080188; PubMed Central PMCID: PMC1626141.

39. Wu P, Chawla A, Spinner RJ, Yu C, Yaszemski MJ, Windebank AJ, et al. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. *Neural Regen Res.* 2014;9(20):1796-809. doi: 10.4103/1673-5374.143424. PubMed PMID: 25422641; PubMed Central PMCID: PMC4239769.
40. Ma J, Shen J, Garrett JP, Lee CA, Li Z, Elsaidi GA, et al. Gene expression of myogenic regulatory factors, nicotinic acetylcholine receptor subunits, and GAP-43 in skeletal muscle following denervation in a rat model. *J Orthop Res.* 2007;25(11):1498-505. doi: 10.1002/jor.20414. PubMed PMID: 17568415.
41. Grosman C, Auerbach A. Kinetic, mechanistic, and structural aspects of unliganded gating of acetylcholine receptor channels: a single-channel study of second transmembrane segment 12' mutants. *J Gen Physiol.* 2000;115(5):621-35. doi: 10.1085/jgp.115.5.621. PubMed PMID: 10779319; PubMed Central PMCID: PMC2217228.
42. Naguib M, Flood P, McArdle JJ, Brenner HR. Advances in neurobiology of the neuromuscular junction: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology.* 2002;96(1):202-31. doi: 10.1097/00000542-200201000-00035. PubMed PMID: 11753022.
43. Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: insights from Torpedo postsynaptic membranes. *Q Rev Biophys.* 2013;46(4):283-322. Epub 20130920. doi: 10.1017/S0033583513000061. PubMed PMID: 24050525; PubMed Central PMCID: PMC3820380.
44. Pinto CG, Leite APS, Sartori AA, Tibúrcio FC, Barraviera B, Junior RSF, et al. Heterologous fibrin biopolymer associated to a single suture stitch enables the return of neuromuscular junction to its mature pattern after peripheral nerve injury. *Injury.* 2021;52(4):731-7. Epub 20201017. doi: 10.1016/j.injury.2020.10.070. PubMed PMID: 33902866.
45. Lacomis D. What's in the Neuromuscular Junction Literature? *J Clin Neuromuscul Dis.* 2020;21(4):195-204. doi: 10.1097/CND.0000000000000285. PubMed PMID: 32453095.
46. Krivoi II, Petrov AM. Cholesterol and the Safety Factor for Neuromuscular Transmission. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5). Epub 20190228. doi: 10.3390/ijms20051046. PubMed PMID: 30823359; PubMed Central PMCID: PMC6429197.
47. Seddon HJ. A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J.* 1942;2(4260):237-9. doi: 10.1136/bmj.2.4260.237. PubMed PMID: 20784403; PubMed Central PMCID: PMC2164137.
48. SUNDERLAND S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain.* 1951;74(4):491-516. doi: 10.1093/brain/74.4.491. PubMed PMID: 14895767.
49. Colli BO. General aspects of acute peripheral nerve injuries. *Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia*1993. p. 29.
50. Modrak M, Talukder MAH, Gurgenshvil K, Noble M, Elfar JC. Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. *J Neurosci Res.* 2020;98(5):780-95. Epub 20191013. doi: 10.1002/jnr.24538. PubMed PMID: 31608497; PubMed Central PMCID: PMC7072007.
51. Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *J Neurosci.* 1995;15(5 Pt 2):3876-85. PubMed PMID: 7751952; PubMed Central PMCID: PMC6578210.
52. Chan KM, Gordon T, Zochodne DW, Power HA. Improving peripheral nerve regeneration: from molecular mechanisms to potential therapeutic targets. *Exp Neurol.* 2014;261:826-35. Epub 20140916. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.09.006. PubMed PMID: 25220611.
53. Yi S, Tang X, Yu J, Liu J, Ding F, Gu X. Microarray and qPCR Analyses of Wallerian Degeneration in Rat Sciatic Nerves. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:22. Epub 20170210. doi: 10.3389/fncel.2017.00022. PubMed PMID: 28239339; PubMed Central PMCID: PMC5301003.
54. Gordon T. Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(22):8652. doi: 10.3390/ijms21228652.
55. Lubińska L. Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor. *Brain Res.* 1982;233(2):227-40. doi: 10.1016/0006-8993(82)91199-4. PubMed PMID: 6174177.

56. Lindborg JA, Mack M, Zigmond RE. Neutrophils Are Critical for Myelin Removal in a Peripheral Nerve Injury Model of Wallerian Degeneration. *J Neurosci*. 2017;37(43):10258-77. Epub 20170914. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2085-17.2017. PubMed PMID: 28912156; PubMed Central PMCID: PMC5656991.
57. Gomez-Sanchez JA, Carty L, Iruarizaga-Lejarreta M, Palomo-Irigoyen M, Varela-Rey M, Griffith M, et al. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *J Cell Biol*. 2015;210(1):153-68. doi: 10.1083/jcb.201503019. PubMed PMID: 26150392; PubMed Central PMCID: PMC4494002.
58. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*. 2011;8:110. Epub 20110830. doi: 10.1186/1742-2094-8-110. PubMed PMID: 21878126; PubMed Central PMCID: PMC3180276.
59. Cattin AL, Burden JJ, Van Emmenis L, Mackenzie FE, Hoving JJ, Garcia Calavia N, et al. Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell*. 2015;162(5):1127-39. Epub 20150813. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.021. PubMed PMID: 26279190; PubMed Central PMCID: PMC4553238.
60. Jiang BG, Han N, Rao F, Wang YL, Kou YH, Zhang PX. Advance of Peripheral Nerve Injury Repair and Reconstruction. *Chin Med J (Engl)*. 2017;130(24):2996-8. doi: 10.4103/0366-6999.220299. PubMed PMID: 29237933; PubMed Central PMCID: PMC5742928.
61. Bombeiro AL, Thomé R, Oliveira Nunes SL, Monteiro Moreira B, Verinaud L, Oliveira AL. MHC-I and PirB Upregulation in the Central and Peripheral Nervous System following Sciatic Nerve Injury. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161463. Epub 20160823. doi: 10.1371/journal.pone.0161463. PubMed PMID: 27551751; PubMed Central PMCID: PMC4995013.
62. Bombeiro AL, Pereira BTN, de Oliveira ALR. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor improves mouse peripheral nerve regeneration following sciatic nerve crush. *Eur J Neurosci*. 2018;48(5):2152-64. Epub 20180829. doi: 10.1111/ejn.14106. PubMed PMID: 30099786.
63. Bombeiro AL, Pereira BTN, Bonfanti AP, Oliveira ALR. Immunomodulation by dimethyl fumarate treatment improves mouse sciatic nerve regeneration. *Brain Res Bull*. 2020;160:24-32. Epub 20200417. doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.04.005. PubMed PMID: 32305403.
64. Bombeiro AL, Lima BHM, Bonfanti AP, Oliveira ALR. Improved mouse sciatic nerve regeneration following lymphocyte cell therapy. *Mol Immunol*. 2020;121:81-91. Epub 20200313. doi: 10.1016/j.molimm.2020.03.003. PubMed PMID: 32172028.
65. Rodríguez-Sánchez DN, Pinto GBA, Cartarozzi LP, de Oliveira ALR, Bovolato ALC, de Carvalho M, et al. 3D-printed nerve guidance conduits multi-functionalized with canine multipotent mesenchymal stromal cells promote neuroregeneration after sciatic nerve injury in rats. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):303. Epub 20210529. doi: 10.1186/s13287-021-02315-8. PubMed PMID: 34051869; PubMed Central PMCID: PMC8164252.
66. Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira RS, Barraviera B, Duek E, Carvalho JL, et al. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *Brain Res Bull*. 2015;112:14-24. Epub 20150117. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.01.005. PubMed PMID: 25602253.
67. Rishal I, Fainzilber M. Axon-soma communication in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(1):32-42. Epub 20131211. doi: 10.1038/nrn3609. PubMed PMID: 24326686.
68. Cullheim S, Thams S. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res Rev*. 2007;55(1):89-96. Epub 20070419. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.03.012. PubMed PMID: 17509690.
69. Blinzinger K, Kreutzberg G. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1968;85(2):145-57. doi: 10.1007/BF00325030. PubMed PMID: 5706753.
70. Alvarez FJ, Titus-Mitchell HE, Bullinger KL, Kraszpulski M, Nardelli P, Cope TC. Permanent central synaptic disconnection of proprioceptors after nerve injury and regeneration. I. Loss of VGLUT1/IA synapses on motoneurons. *J Neurophysiol*. 2011;106(5):2450-70. Epub 20110810. doi: 10.1152/jn.01095.2010. PubMed PMID: 21832035; PubMed Central PMCID: PMC3214094.

71. Rotterman TM, Akhter ET, Lane AR, MacPherson KP, García VV, Tansey MG, et al. Spinal Motor Circuit Synaptic Plasticity after Peripheral Nerve Injury Depends on Microglia Activation and a CCR2 Mechanism. *J Neurosci.* 2019;39(18):3412-33. Epub 20190304. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2945-17.2019. PubMed PMID: 30833511; PubMed Central PMCID: PMC6495126.
72. Alvarez FJ, Rotterman TM, Akhter ET, Lane AR, English AW, Cope TC. Synaptic Plasticity on Motoneurons After Axotomy: A Necessary Change in Paradigm. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:68. Epub 20200430. doi: 10.3389/fnmol.2020.00068. PubMed PMID: 32425754; PubMed Central PMCID: PMC7203341.
73. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997;14(1-2):67-116. doi: 10.1007/BF02740621. PubMed PMID: 9170101.
74. Ma CH, Omura T, Cobos EJ, Latrémolière A, Ghasemlou N, Brenner GJ, et al. Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4332-47. Epub 20111003. doi: 10.1172/JCI58675. PubMed PMID: 21965333; PubMed Central PMCID: PMC3223863.
75. Sakuma M, Gorski G, Sheu SH, Lee S, Barrett LB, Singh B, et al. Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. *Eur J Neurosci.* 2016;43(3):451-62. Epub 20150928. doi: 10.1111/ejn.13059. PubMed PMID: 26332731; PubMed Central PMCID: PMC4738060.
76. Moimas S, Novati F, Ronchi G, Zacchigna S, Fregnan F, Zentilin L, et al. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. *Gene Ther.* 2013;20(10):1014-21. Epub 20130530. doi: 10.1038/gt.2013.26. PubMed PMID: 23719064; PubMed Central PMCID: PMC3795473.
77. Leite APS, Pinto CG, Tibúrcio FC, Muller KS, Padovani CR, Barraviera B, et al. Acetylcholine receptors of the neuromuscular junctions present normal distribution after peripheral nerve injury and repair through nerve guidance associated with fibrin biopolymer. *Injury.* 2023;54(2):345-61. Epub 20221123. doi: 10.1016/j.injury.2022.11.047. PubMed PMID: 36446670.
78. Rios R, Jablonka-Shariff A, Broberg C, Snyder-Warwick AK. Macrophage roles in peripheral nervous system injury and pathology: Allies in neuromuscular junction recovery. *Mol Cell Neurosci.* 2021;111:103590. Epub 20210108. doi: 10.1016/j.mcn.2021.103590. PubMed PMID: 33422671; PubMed Central PMCID: PMC8235592.
79. Su HL, Chiang CY, Lu ZH, Cheng FC, Chen CJ, Sheu ML, et al. Late administration of high-frequency electrical stimulation increases nerve regeneration without aggravating neuropathic pain in a nerve crush injury. *BMC Neurosci.* 2018;19(1):37. Epub 20180625. doi: 10.1186/s12868-018-0437-9. PubMed PMID: 29940857; PubMed Central PMCID: PMC6020201.
80. Chao T, Frump D, Lin M, Caiozzo VJ, Mozaffar T, Steward O, et al. Matrix metalloproteinase 3 deletion preserves denervated motor endplates after traumatic nerve injury. *Ann Neurol.* 2013;73(2):210-23. Epub 20121231. doi: 10.1002/ana.23781. PubMed PMID: 23281061.
81. Palispis WA, Gupta R. Surgical repair in humans after traumatic nerve injury provides limited functional neural regeneration in adults. *Exp Neurol.* 2017;290:106-14. Epub 20170119. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.01.009. PubMed PMID: 28111229.
82. Jablonka-Shariff A, Lu CY, Campbell K, Monk KR, Snyder-Warwick AK. Gpr126/Adgrg6 contributes to the terminal Schwann cell response at the neuromuscular junction following peripheral nerve injury. *Glia.* 2020;68(6):1182-200. Epub 20191224. doi: 10.1002/glia.23769. PubMed PMID: 31873966; PubMed Central PMCID: PMC7148175.
83. Cisterna BA, Cardozo C, Sáez JC. Neuronal involvement in muscular atrophy. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:405. Epub 20141210. doi: 10.3389/fncel.2014.00405. PubMed PMID: 25540609; PubMed Central PMCID: PMC4261799.
84. Guarino SR, Canciani A, Forneris F. Dissecting the Extracellular Complexity of Neuromuscular Junction Organizers. *Front Mol Biosci.* 2019;6:156. Epub 20200110. doi: 10.3389/fmolb.2019.00156. PubMed PMID: 31998752; PubMed Central PMCID: PMC6966886.

85. VanSaun M, Humburg BC, Arnett MG, Pence M, Werle MJ. Activation of Matrix Metalloproteinase-3 is altered at the frog neuromuscular junction following changes in synaptic activity. *Dev Neurobiol.* 2007;67(11):1488-97. doi: 10.1002/dneu.20523. PubMed PMID: 17525979.
86. Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol.* 2008;119(9):1951-65. Epub 20080514. doi: 10.1016/j.clinph.2008.03.018. PubMed PMID: 18482862.
87. Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JP. Overall assessment of regeneration in peripheral nerve lesion repair using fibrin glue, suture, or a combination of the 2 techniques in a rat model. Which is the ideal choice? *Surg Neurol.* 2005;64 Suppl 1:S1:10-6; discussion S1:6. doi: 10.1016/j.surneu.2005.04.022. PubMed PMID: 15967220.
88. Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol.* 2010;223(1):77-85. Epub 20090405. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.03.031. PubMed PMID: 19348799; PubMed Central PMCID: PMC2849924.
89. Wanner R, Gey M, Abaei A, Warnecke D, de Roy L, Dürselen L, et al. Functional and Molecular Characterization of a Novel Traumatic Peripheral Nerve-Muscle Injury Model. *Neuromolecular Med.* 2017;19(2-3):357-74. Epub 20170708. doi: 10.1007/s12017-017-8450-1. PubMed PMID: 28689354.
90. Sulaiman W, Gordon T. Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. *Ochsner J.* 2013;13(1):100-8. PubMed PMID: 23531634; PubMed Central PMCID: PMC3603172.
91. Biscola NP, Cartarozzi LP, Ulian-Benitez S, Barbizan R, Castro MV, Spejo AB, et al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2017;23:13. Epub 20170314. doi: 10.1186/s40409-017-0103-1. PubMed PMID: 28293254; PubMed Central PMCID: PMC5348778.
92. Robinson PP, Loescher AR, Smith KG. A prospective, quantitative study on the clinical outcome of lingual nerve repair. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000;38(4):255-63. doi: 10.1054/bjom.2000.0463. PubMed PMID: 10922146.
93. Peretti GM, Randolph MA, Zaporozhan V, Bonassar LJ, Xu JW, Fellers JC, et al. A biomechanical analysis of an engineered cell-scaffold implant for cartilage repair. *Ann Plast Surg.* 2001;46(5):533-7. doi: 10.1097/0000637-200105000-00013. PubMed PMID: 11352428.
94. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittlinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften.* 2002;89(8):338-51. Epub 20020723. doi: 10.1007/s00114-002-0344-9. PubMed PMID: 12435034.
95. de Barros CN, Miluzzi Yamada AL, Junior RS, Barraviera B, Hussni CA, de Souza JB, et al. A new heterologous fibrin sealant as a scaffold to cartilage repair-Experimental study and preliminary results. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;241(13):1410-5. Epub 20150810. doi: 10.1177/1535370215597192. PubMed PMID: 26264444; PubMed Central PMCID: PMC4994917.
96. Bayer IS. Advances in Fibrin-Based Materials in Wound Repair: A Review. *Molecules.* 2022;27(14). Epub 20220714. doi: 10.3390/molecules27144504. PubMed PMID: 35889381; PubMed Central PMCID: PMC9322155.
97. Buchta C, Dettke M, Funovics PT, Höcker P, Knöbl P, Macher M, et al. Fibrin sealant produced by the CryoSeal FS System: product chemistry, material properties and possible preparation in the autologous preoperative setting. *Vox Sang.* 2004;86(4):257-62. doi: 10.1111/j.0042-9007.2004.00516.x. PubMed PMID: 15144531.
98. Sameem M, Wood TJ, Bain JR. A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(6):2381-90. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182131cf5. PubMed PMID: 21311390.
99. Buchaim DV, Cassaro CV, Shindo JVTC, Coletta BBD, Pomini KT, Rosso MPO, et al. Unique heterologous fibrin biopolymer with hemostatic, adhesive, sealant, scaffold and drug delivery properties: a systematic review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2019;25:e20190038. Epub 20191111. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0038. PubMed PMID: 31839802; PubMed Central PMCID: PMC6894437.
100. Koopman JE, Duraku LS, de Jong T, de Vries RBM, Michiel Zuidam J, Hundepool CA. A systematic review and meta-analysis on the use of fibrin glue in peripheral nerve repair: Can we just

- glue it? *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2022;75(3):1018-33. Epub 20220119. doi: 10.1016/j.bjps.2022.01.007. PubMed PMID: 35125308.
101. Barros LC, Ferreira RS, Barraviera SR, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJ, et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2009;12(8):553-71. doi: 10.1080/10937400903442514. PubMed PMID: 20183534.
 102. Ferreira RS, de Barros LC, Abbade LPF, Barraviera SRCS, Silveiras MRC, de Pontes LG, et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside - an overview. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2017;23:21. Epub 20170404. doi: 10.1186/s40409-017-0109-8. PubMed PMID: 28396682; PubMed Central PMCID: PMC5379742.
 103. Fattahi T, Mohan M, Caldwell GT. Clinical applications of fibrin sealants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(2):218-24. doi: 10.1016/j.joms.2003.01.005. PubMed PMID: 14762755.
 104. Abbade LPF, Ferreira RS, Dos Santos LD, Barraviera B. Chronic venous ulcers: a review on treatment with fibrin sealant and prognostic advances using proteomic strategies. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2020;26:e20190101. Epub 20200622. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0101. PubMed PMID: 32636876; PubMed Central PMCID: PMC7315627.
 105. Abbade LPF, Barraviera SRCS, Silveiras MRC, Lima ABBC, Haddad GR, Gatti MAN, et al. Treatment of Chronic Venous Ulcers With Heterologous Fibrin Sealant: A Phase I/II Clinical Trial. *Front Immunol.* 2021;12:627541. Epub 20210223. doi: 10.3389/fimmu.2021.627541. PubMed PMID: 33708219; PubMed Central PMCID: PMC7940668.
 106. Leite APS, Pinto CG, Tibúrcio FC, Sartori AA, de Castro Rodrigues A, Barraviera B, et al. Heterologous fibrin sealant potentiates axonal regeneration after peripheral nerve injury with reduction in the number of suture points. *Injury.* 2019;50(4):834-47. Epub 20190319. doi: 10.1016/j.injury.2019.03.027. PubMed PMID: 30922661.
 107. Tibúrcio FC, Muller KS, Leite APS, de Oliveira IRA, Barraviera B, Ferreira RS, et al. Neuroregeneration and immune response after neurorrhaphy are improved with the use of heterologous fibrin biopolymer in addition to suture repair alone. *Muscle Nerve.* 2023;67(6):522-36. Epub 20230325. doi: 10.1002/mus.27815. PubMed PMID: 36905197.
 108. Buchaim RL, Andreo JC, Barraviera B, Ferreira Junior RS, Buchaim DV, Rosa Junior GM, et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *Injury.* 2015;46(4):655-60. Epub 20150124. doi: 10.1016/j.injury.2015.01.031. PubMed PMID: 25669962.
 109. Ortiz AC, Fideles SOM, Pomini KT, Bellini MZ, Pereira ESBM, Reis CHB, et al. Potential of Fibrin Glue and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) to Regenerate Nerve Injuries: A Systematic Review. *Cells.* 2022;11(2). Epub 20220110. doi: 10.3390/cells11020221. PubMed PMID: 35053336; PubMed Central PMCID: PMC8773549.
 110. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089. PubMed PMID: 22930834; PubMed Central PMCID: PMC5554542.
 111. Zaimi A, Wabartha M, Herman V, Antonsanti PL, Perone CS, Cohen-Adad J. AxonDeepSeg: automatic axon and myelin segmentation from microscopy data using convolutional neural networks. *Sci Rep.* 2018;8(1):3816. Epub 20180228. doi: 10.1038/s41598-018-22181-4. PubMed PMID: 29491478; PubMed Central PMCID: PMC5830647.
 112. Muller KS, Tibúrcio FC, de Barros JWF, Matsumura CY, Matheus SMM. Statin exposure during pregnancy promotes neuromuscular junction alterations in postpartum Wistar rats. *Muscle Nerve.* 2023;67(6):537-47. Epub 20230411. doi: 10.1002/mus.27825. PubMed PMID: 36975763.
 113. Lopes B, Sousa P, Alvites R, Branquinho M, Sousa AC, Mendonça C, et al. Peripheral Nerve Injury Treatments and Advances: One Health Perspective. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2). Epub 20220114. doi: 10.3390/ijms23020918. PubMed PMID: 35055104; PubMed Central PMCID: PMC8779751.
 114. Spejo AB, Chiarotto GB, Ferreira ADF, Gomes DA, Ferreira RS, Barraviera B, et al. Neuroprotection and immunomodulation following intraspinal axotomy of motoneurons by treatment

- with adult mesenchymal stem cells. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):230. Epub 20180814. doi: 10.1186/s12974-018-1268-4. PubMed PMID: 30107848; PubMed Central PMCID: PMC6092804.
115. Kempe PRG, Chiarotto GB, Barraviera B, Ferreira RS, de Oliveira ALR. Neuroprotection and immunomodulation by dimethyl fumarate and a heterologous fibrin biopolymer after ventral root avulsion and reimplantation. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2020;26:e20190093. Epub 20200520. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0093. PubMed PMID: 32518556; PubMed Central PMCID: PMC7250131.
 116. Bueno CRS, Tonin MCC, Buchaim DV, Barraviera B, Ferreira Junior RS, Santos PSDS, et al. Morphofunctional Improvement of the Facial Nerve and Muscles with Repair Using Heterologous Fibrin Biopolymer and Photobiomodulation. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(5). Epub 20230427. doi: 10.3390/ph16050653. PubMed PMID: 37242436; PubMed Central PMCID: PMC10223113.
 117. Scorisa JM, Zanon RG, Freria CM, de Oliveira AL. Glatiramer acetate positively influences spinal motoneuron survival and synaptic plasticity after ventral root avulsion. *Neurosci Lett*. 2009;451(1):34-9. Epub 20081216. doi: 10.1016/j.neulet.2008.12.017. PubMed PMID: 19103252.
 118. Kempe PRG, de Castro MV, Khuriyeh VC, Barraviera B, Ferreira RS, de Oliveira ALR. Ultrastructural Evidence of Synapse Preservation and Axonal Regeneration Following Spinal Root Repair with Fibrin Biopolymer and Therapy with Dimethyl Fumarate. *Polymers (Basel)*. 2023;15(15). Epub 20230726. doi: 10.3390/polym15153171. PubMed PMID: 37571065.
 119. LEHRER GM, ORNSTEIN L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *J Biophys Biochem Cytol*. 1959;6:399-406. doi: 10.1083/jcb.6.3.399. PubMed PMID: 14415404; PubMed Central PMCID: PMC2224705.
 120. Jones RA, Reich CD, Dissanayake KN, Kristmundsdottir F, Findlater GS, Ribchester RR, et al. NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure-function relationships at the neuromuscular junction. *Open Biol*. 2016;6(12). doi: 10.1098/rsob.160240. PubMed PMID: 27927794; PubMed Central PMCID: PMC5204123.
 121. Lehto M, Järvinen M, Nelimarkka O. Scar formation after skeletal muscle injury. A histological and autoradiographical study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg (1978)*. 1986;104(6):366-70. doi: 10.1007/BF00454432. PubMed PMID: 3964044.
 122. Folker ES, Baylies MK. Nuclear positioning in muscle development and disease. *Front Physiol*. 2013;4:363. Epub 20131212. doi: 10.3389/fphys.2013.00363. PubMed PMID: 24376424; PubMed Central PMCID: PMC3859928.
 123. Ogawa Y, Yamamoto M, Sato M, Odaka K, Kasahara M, Hinata N, et al. Localization of T-cell factor 4 positive fibroblasts and CD206-positive macrophages during skeletal muscle regeneration in mice. *Ann Anat*. 2021;235:151694. Epub 20210208. doi: 10.1016/j.aanat.2021.151694. PubMed PMID: 33571646.
 124. Martínez-Martínez P, Losen M, Duimel H, Frederik P, Spaans F, Molenaar P, et al. Overexpression of rapsyn in rat muscle increases acetylcholine receptor levels in chronic experimental autoimmune myasthenia gravis. *Am J Pathol*. 2007;170(2):644-57. doi: 10.2353/ajpath.2007.060676. PubMed PMID: 17255332; PubMed Central PMCID: PMC1851878.
 125. Moresi V, Williams AH, Meadows E, Flynn JM, Potthoff MJ, McAnally J, et al. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell*. 2010;143(1):35-45. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.004. PubMed PMID: 20887891; PubMed Central PMCID: PMC2982779.
 126. Gao N, Zhao K, Cao Y, Ren X, Jing H, Xing G, et al. A Role of Lamin A/C in Preventing Neuromuscular Junction Decline in Mice. *J Neurosci*. 2020;40(38):7203-15. Epub 20200817. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0443-20.2020. PubMed PMID: 32817327; PubMed Central PMCID: PMC7534915.
 127. Liao X, Wang Y, Lai X, Wang S. The role of Rapsyn in neuromuscular junction and congenital myasthenic syndrome. *Biomol Biomed*. 2023;23(5):772-84. Epub 20230904. doi: 10.17305/bb.2022.8641. PubMed PMID: 36815443; PubMed Central PMCID: PMC10494853.
 128. Xing G, Xiong WC, Mei L. Rapsyn as a signaling and scaffolding molecule in neuromuscular junction formation and maintenance. *Neurosci Lett*. 2020;731:135013. Epub 20200426. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135013. PubMed PMID: 32344108.

129. Yang X, Xue P, Chen H, Yuan M, Kang Y, Duscher D, et al. Denervation drives skeletal muscle atrophy and induces mitochondrial dysfunction, mitophagy and apoptosis via miR-142a-5p/MFN1 axis. *Theranostics*. 2020;10(3):1415-32. Epub 20200101. doi: 10.7150/thno.40857. PubMed PMID: 31938072; PubMed Central PMCID: PMC6956801.
130. Ge MH, Tian H, Mao L, Li DY, Lin JQ, Hu HS, et al. Zinc attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury by activating Nrf2/GPX4 defense pathway. *CNS Neurosci Ther*. 2021;27(9):1023-40. Epub 20210505. doi: 10.1111/cns.13657. PubMed PMID: 33951302; PubMed Central PMCID: PMC8339532.
131. Schmalbruch H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec*. 1986;215(1):71-81. doi: 10.1002/ar.1092150111. PubMed PMID: 3706794.
132. Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Methods*. 2003;129(2):183-90. doi: 10.1016/s0165-0270(03)00207-3. PubMed PMID: 14511820.
133. Rosso MPO, Rosa Júnior GM, Buchaim DV, German IJS, Pomini KT, de Souza RG, et al. Stimulation of morphofunctional repair of the facial nerve with photobiomodulation, using the end-to-side technique or a new heterologous fibrin sealant. *J Photochem Photobiol B*. 2017;175:20-8. Epub 20170818. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.08.023. PubMed PMID: 28846931.
134. Furey MJ, Midha R, Xu QG, Belkas J, Gordon T. Prolonged target deprivation reduces the capacity of injured motoneurons to regenerate. *Neurosurgery*. 2007;60(4):723-32; discussion 32-3. doi: 10.1227/01.NEU.0000255412.63184.CC. PubMed PMID: 17415210.
135. Tu H, Zhang D, Corrick RM, Muellemann RL, Wadman MC, Li YL. Morphological Regeneration and Functional Recovery of Neuromuscular Junctions after Tourniquet-Induced Injuries in Mouse Hindlimb. *Front Physiol*. 2017;8:207. Epub 20170406. doi: 10.3389/fphys.2017.00207. PubMed PMID: 28428759; PubMed Central PMCID: PMC5382216.
136. Wiberg R, Jonsson S, Novikova LN, Kingham PJ. Investigation of the Expression of Myogenic Transcription Factors, microRNAs and Muscle-Specific E3 Ubiquitin Ligases in the Medial Gastrocnemius and Soleus Muscles following Peripheral Nerve Injury. *PLoS One*. 2015;10(12):e0142699. Epub 20151221. doi: 10.1371/journal.pone.0142699. PubMed PMID: 26691660; PubMed Central PMCID: PMC4686181.
137. Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*. 2007;82(4):163-201. Epub 20070622. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.06.005. PubMed PMID: 17643733.
138. Barbizan R, Castro MV, Rodrigues AC, Barraviera B, Ferreira RS, Oliveira AL. Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. *PLoS One*. 2013;8(5):e63260. Epub 20130507. doi: 10.1371/journal.pone.0063260. PubMed PMID: 23667596; PubMed Central PMCID: PMC3646764.
139. Perussi Biscola N, Politti Cartarozzi L, Ferreira Junior RS, Barraviera B, Leite Rodrigues de Oliveira A. Long-Standing Motor and Sensory Recovery following Acute Fibrin Sealant Based Neonatal Sciatic Nerve Repair. *Neural Plast*. 2016;2016:9028126. Epub 20160629. doi: 10.1155/2016/9028126. PubMed PMID: 27446617; PubMed Central PMCID: PMC4942656.
140. Cartarozzi LP, Perez M, Fernandes GG, Chiarotto GB, Luzo Â, Campos AC, et al. Neuroprotection and gliosis attenuation by intravenous application of human mesenchymal stem cells (hMSC) following ventral root crush in mice. *Mol Cell Neurosci*. 2022;118:103694. Epub 20211224. doi: 10.1016/j.mcn.2021.103694. PubMed PMID: 34954382.
141. Paes SM, Castro MV, Barbosa RM, Politti Cartarozzi L, Coser LO, Kempe PRG, et al. Human dental pulp stem cell monolayer and spheroid therapy after spinal motor root avulsion in adult rats. *Brain Res*. 2023;1802:148229. Epub 20221230. doi: 10.1016/j.brainres.2022.148229. PubMed PMID: 36592804.
142. Barbizan R, Castro MV, Barraviera B, Ferreira RS, Oliveira AL. Influence of delivery method on neuroprotection by bone marrow mononuclear cell therapy following ventral root reimplantation with fibrin sealant. *PLoS One*. 2014;9(8):e105712. Epub 20140826. doi: 10.1371/journal.pone.0105712. PubMed PMID: 25157845; PubMed Central PMCID: PMC4144952.

143. Perez JC, Gerber YN, Perrin FE. Dynamic Diversity of Glial Response Among Species in Spinal Cord Injury. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:769548. Epub 20211126. doi: 10.3389/fnagi.2021.769548. PubMed PMID: 34899275; PubMed Central PMCID: PMC8662749.
144. Mason CA, Edmondson JC, Hatten ME. The extending astroglial process: development of glial cell shape, the growing tip, and interactions with neurons. *J Neurosci.* 1988;8(9):3124-34. doi: 10.1523/JNEUROSCI.08-09-03124.1988. PubMed PMID: 3171670; PubMed Central PMCID: PMC6569428.
145. Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci.* 2010;17(1):6-10. Epub 20091118. doi: 10.1016/j.jocn.2009.05.006. PubMed PMID: 19926287; PubMed Central PMCID: PMC3786731.
146. Zochodne DW, Cheng C. Neurotrophins and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips. *J Anat.* 2000;196 (Pt 2)(Pt 2):279-83. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19620279.x. PubMed PMID: 10739024; PubMed Central PMCID: PMC1468061.
147. Rentería I, García-Suárez PC, Fry AC, Moncada-Jiménez J, Machado-Parra JP, Antunes BM, et al. The Molecular Effects of BDNF Synthesis on Skeletal Muscle: A Mini-Review. *Front Physiol.* 2022;13:934714. Epub 20220706. doi: 10.3389/fphys.2022.934714. PubMed PMID: 35874524; PubMed Central PMCID: PMC9306488.
148. Oliveira AL, Risling M, Negro A, Langone F, Cullheim S. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. *J Comp Neurol.* 2002;447(4):381-93. doi: 10.1002/cne.10248. PubMed PMID: 11992523.
149. Hoffman PN, Cleveland DW, Griffin JW, Landes PW, Cowan NJ, Price DL. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(10):3472-6. doi: 10.1073/pnas.84.10.3472. PubMed PMID: 3472217; PubMed Central PMCID: PMC304893.

Conclusão

Nossos resultados destacam os efeitos benéficos tardios do BHF na reparação da lesão e asseguram seu potencial para superar os efeitos de regeneração alcançados pela neurografia sozinha, endossando o BHF como um bioproduto promissor para ensaios clínicos.

De fato, aos 120 dias, o BHF demonstrou uma boa capacidade para prevenir e manter um microambiente menos degenerado e impactado em todo o eixo da interação neuromuscular em comparação a neurografia.

Em relação ao ambiente do sistema nervoso central, sugerimos que o BHF apresenta potencial para melhorar a preservação dos neurônios motores e sua subsequente regeneração. Aos 120 dias, há redução da morte neuronal e microgliose crônica, além da atenuação da desorganização neuronal e uma integridade nervosa mais próxima do grupo controle, em comparação a neurografia isolada. A associação ao BHF beneficia o microambiente medular.

Em relação ao ambiente do sistema nervoso periférico, após 120 dias de reconstrução, o BHF associado à neurografia preveniu a fibrose e a atrofia muscular. Isso possivelmente aconteceu devido ao aumento substancial nos axônios regenerados no grupo NB e sua posterior reinervação.

Tomados em conjuntos, esses resultados contribuem para uma melhor preservação e restauração nervosa, manutenção da função e saúde muscular como um todo.