

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/07/2023.



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

Felipe Cantore Tibúrcio

**RECONSTRUÇÃO NERVOSA VIA NEURORRAFIA ASSOCIADA
AO BIOPOLÍMERO HETERÓLOGO DE FIBRINA
Avaliação da resposta inflamatória e interação neuromuscular**

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 Morfologia.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

Coorientadora: Dra. Carina Guidi Pinto

**Botucatu, SP
2021**

Felipe Cantore Tibúrcio

RECONSTRUÇÃO NERVOSA VIA NEURORRAFIA
ASSOCIADA AO BIOPOLÍMERO HETERÓLOGO DE
FIBRINA

Avaliação da resposta inflamatória e interação
neuromuscular

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 Morfologia.

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

Área de Conhecimento: Morfologia
(2.06.00.00-3)

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus
Coorientadora: Dra. Carina Guidi Pinto

Botucatu, SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tibúrcio, Felipe Cantore.

Reconstrução nervosa via neurorrafia associada ao biopolímero heterólogo de fibrina : avaliação da resposta inflamatória e interação neuromuscular / Felipe Cantore Tibúrcio. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Selma Maria Michelin Matheus

Coorientador: Carina Guidi Pinto

Capes: 20600003

1. Biopolímeros. 2. Fibrina. 3. Resposta imune.
4. Regeneração nervosa. 5. Inflamação.

Palavras-chave: Biopolímero de fibrina; Interação neuromuscular; Lesão nervosa periférica; Regeneração nervosa; Resposta imune.

Dedicatória

***A todos os indivíduos acometidos
por lesões traumáticas de nervo
periférico.***

*Que a Ciência um dia encontre um
tratamento que garanta a recuperação
e a qualidade de vida desses
pacientes.*

*"O que sabemos é uma gota, o que
ignoramos é um oceano" (Sir Isaac Newton).*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ser meu refúgio e minha fortaleza e por me guiar nesta jornada.

*"Porquanto tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei...
estarei com ele na angústia; dela o retirarei, e o glorificarei."*

A minha **família**, pais, avós, tias, primas... por todo o amor, carinho e união, que estejamos sempre juntos pro que der e vier.

Em especial a minha **mãe Rosemeire** e minha **vó Neuza** por sempre estarem ao meu lado, me apoiarem, confiarem e acreditarem em mim.

A minha orientadora **Profa. Dra. Selma M. M. Matheus**, por ser uma orientadora excepcional, apaixonada pelo que faz, um exemplo pessoal e profissional no qual eu me espelho. Por todas as oportunidades, aprendizados, conhecimento e experiência compartilhados, pela confiança e dedicação, e por despertar ainda mais o meu amor pelo estudo e ensino da Anatomia.

A minha coorientadora e amiga **Dra. Carina Guidi**, por toda ajuda na realização das cirurgias e coletas que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho. Por todo apoio e ensinamentos, amizade, carinho e dedicação, e por todas as risadas e momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório **Kevin, Igor, Gabriel e Maria Antônia**, que foram meus ICs e me auxiliaram muito na realização deste trabalho, sem vocês eu não teria conseguido, muito obrigado.

Em especial a **Ana Paula**, minha grande amiga e a melhor parceira de laboratório que eu poderia ter. Por toda experiência e conhecimento compartilhados, por toda ajuda, dedicação, apoio e companheirismo vivido no dia a dia.

Ao **Jorge**, meu companheiro de todos os momentos, por estar sempre comigo nas alegrias e tristezas, na saúde e na doença. Por toda convivência, apoio e dedicação. Por sempre me ajudar e me aguentar, e por fazer os meus dias e a minha vida mais feliz.

A minha amiga **Thamiris**, que passou de amiga, a vizinha, a colega de casa, e agora é uma das saudades que Botucatu nos deixa. Obrigado por todo companheirismo e apoio, pelos momentos divertidos, conversas e risadas que tivemos.

Aos meus **amigos**, mesmo que distantes; a maioria cuja amizade trouxe da Graduação, amizades especiais que começaram em Botucatu e vou levar para a vida toda.

Aos **Profs. Drs. Renato Ferretti, Camila Francia, Raquel Domeniconi e Claudia Pellizzon**, por terem me dado à oportunidade de realizar Estágio de Docência, Aprimoramento Didático e Programa de Aprendizagem. Que me permitiram uma maior aproximação com a prática docente e o processo ensino-aprendizagem nas áreas de Anatomia Humana e Comparada e Histologia.

Aos **Profs. Drs. José de Anchieta e Pedro Hamamoto**, pela participação em minhas Bancas de Acompanhamento que permitiram melhorar este trabalho.

Aos alunos, docentes e técnicos do **Setor de Anatomia** do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do IBB/Unesp, por todo auxílio, companheirismo, incentivo e amizade.

Em especial ao **Gelson** pelo auxílio na realização das técnicas histológicas.

Ao **CEVAP** da Unesp de Botucatu, pela colaboração científica e por ceder o biopolímero de fibrina para a realização deste trabalho.

Ao Programa de **Pós-Graduação em Cirurgia e Medicina Translacional** da FMB/Unesp, que me permitiu realizar este Mestrado.

Em especial a **Márcia Fonseca Piagentini Cruz**, secretária do Programa, por todo auxílio burocrático e por estar sempre pronta a nos atender e ajudar.

A **Unipex** da FMB/Unesp e seus servidores, pela estrutura e auxílio físico e instrumental, que foram indispensáveis para realização deste estudo.

Em especial aos técnicos do Laboratório de Cirurgia Experimental, **Zé e Bardella**; aos bioteristas, **Robson e Sílvio**; ao **Diego**, veterinário responsável; e aos técnicos do Laboratório de Histotecnologia, **Leandro e Denise**.

As agências de fomento **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado, e a **CNPq**, pela bolsa de iniciação científica/PIBIC vinculada a este estudo.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani**, pelo auxílio com todas as análises estatísticas.

Ao **Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega** e suas alunas **Beatriz** e **Maira**, e a **Profa. Dra. Mirela Barros Dias** e seus alunos **Laisa** e **Bruno** pela disponibilidade e auxílio no uso dos equipamentos.

Aos membros da minha banca de qualificação, **Profs. Drs. Cintia Matsumura** e **André Bombeiro**, pelas muitas contribuições que ajudaram a melhorar este trabalho.

E aos membros da minha banca de defesa, **Profas. Dras. Adriana Pertille** e **Cintia Matsumura** pela disponibilidade e por terem aceitado este convite.

Aos **animais** que doaram suas vidas involuntariamente para a realização deste trabalho.

“Ao cadáver que, jacente na fria lousa do laboratório, me permitiu aprender Anatomia”.

(Prof. Tit. Valdemar de Freitas, 2004.)

Muito obrigado!

Epígrafe

"Seu nome só Deus o sabe; mas o destino inexorável deu-lhe o poder e a grandeza de servir a humanidade que por ele passou indiferente."

Karl Rokitansky, 1876.

Resumo

As lesões nervosas periféricas (LNPs) afetam, além do nervo, a inervação do músculo e as junções neuromusculares (JNMs) associadas. Ocorrem diversas alterações morfofuncionais e moleculares, além de uma intensa resposta imune, principalmente macrofágica. Métodos alternativos de reparo vêm sendo utilizados a fim de potencializar a regeneração nervosa como o biopolímero heterólogo de fibrina (BHF). O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do BHF associado à neurorrafia no reparo do nervo isquiático, com ênfase no microambiente da lesão e na interação neuromuscular. Quarenta ratos Wistar (CEUA/IBB/Unesp: 1177/2019) foram distribuídos em 4 grupos (n = 10/grupo). No grupo Controle (C) foi realizada a localização do nervo. No grupo Desnervado (D), neurotmeze e remoção de fragmento de 6 mm, inversão dos cotos e fixação na tela subcutânea. No grupo Sutura (S), neurotmeze seguida de neurorrafia. No grupo Sutura + BHF (SB), neurotmeze seguida de neurorrafia e acrescido o BHF. Os animais foram eutanasiados aos 7 e 30 dias após cirurgia. Os nervos e os músculos sóleos foram coletados para análise semiquantitativa dos macrófagos M2 (CD206+); análise morfológica e morfométrica do nervo, do músculo e das JNMs; quantificação de tecido conjuntivo intramuscular. O grupo SB foi o único que apresentou semelhança ou maior proximidade ao grupo C, em relação ao número de axônios aos 7 dias; e ao número, área e densidade dos vasos sanguíneos, angulação e ângulo de Feret das JNMs, número de núcleos centrais e quantificação de tecido conjuntivo do músculo, aos 30 dias. Também aos 7 dias no grupo SB, houve aumento da área do nervo, número e área dos vasos sanguíneos em relação aos outros grupos. E ainda no grupo SB aos 7 e 30 dias houve aumento da área dos macrófagos M2 em relação a todos os outros grupos. Esses resultados demonstram o potencial do BHF em acelerar a regeneração nervosa, induzir angiogênese e potencializar a resposta imune, além de prevenir degeneração muscular severa, com menor grau de fibrose e auxiliar no retorno das JNMs aos seus padrões morfológicos normais. O BHF fornece um microambiente favorável, que melhora a regeneração nervosa, e assim, vantajoso no reparo de nervos periféricos.

Palavras-chave: Biopolímero de fibrina; Interação neuromuscular; Lesão nervosa periférica; Macrófagos; Neurorrafia; Regeneração nervosa; Resposta imune.

Abstract

Peripheral nerve injuries (PNIs) affect, in addition to the nerve, muscle innervation and associated neuromuscular junctions (NMJs). There are several morphofunctional and molecular changes, in addition to an intense immune response, mainly macrophagic. Alternative repair methods have been used in order to enhance nerve regeneration, such as the heterologous fibrin biopolymer (HFB). The purpose of this study was to evaluate the effects of HFB associated with neurorrhaphy on sciatic nerve repair, with emphasis on the microenvironment of the injury and on neuromuscular interaction. Forty Wistar rats (CEUA/IBB/Unesp: 1177/2019) were distributed into 4 groups (n = 10/group). In the Control group (C), the location of the nerve was performed. In the Denervated group (D), neurotmesis and removal of a 6 mm fragment, inversion of the stumps and fixation in the subcutaneous tissue. In the Suture (S) group, neurotmesis followed by neurorrhaphy. In the Suture + BHF (SB) group, neurotmesis followed by neurorrhaphy plus BHF. Animals were euthanized at 7 and 30 days after surgery. The nerves and soleus muscles were collected for semiquantitative analysis of macrophages M2 (CD206+); morphological and morphometric analysis of the nerve, muscle and NMJs; quantification of intramuscular connective tissue. Group SB was the only one that showed similarity or greater proximity to group C, in relation to the number of axons at 7 days; and the number, area and density of blood vessels, angulation and Feret angle of NMJs, number of central nuclei and quantification of muscle connective tissue, at 30 days. Also at 7 days in the SB group, there was an increase in the nerve area, number and area of blood vessels in relation to the other groups. And even in the SB group at 7 and 30 days there was an increase in the area of M2 macrophages compared to all other groups. These results demonstrate the potential of BHF in accelerating nerve regeneration, inducing angiogenesis and potentiating the immune response, in addition to preventing severe muscle degeneration with a lower degree of fibrosis and helping to return NMJs to their normal morphological patterns, which improves nerve regeneration, and thus is advantageous in peripheral nerve repair.

Keywords: Fibrin biopolymer; Immune response; Macrophages; Neuromuscular interaction; Neurorrhaphy; Nerve regeneration; Peripheral nerve injury.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Esquema geral de um neurônio e seus componentes celulares.

Figura 2 – Fotomicrografia de secção transversal de nervo isquiático corado com tetróxido de ósmio e azul de toluidina e representação esquemática de um nervo espinal em corte transversal. A: Epineuro. B: Perineuro. C: Endoneuro. D: Bainha de mielina.

Figura 3 – Representação da inervação do músculo estriado esquelético. Desde a origem do neurônio motor inferior na coluna anterior da medula espinal até sua inervação propriamente dita ao se conectar com a fibra muscular, formando a junção neuromuscular.

Figura 4 – Representação de uma junção neuromuscular seus componentes e compartimentos. Membranas pré- e pós-sináptica e fenda sináptica.

Figura 5 – Esquema das classificações das lesões nervosas periféricas representando os graus de dano ao nervo e seus componentes afetados. Classificação de Seddon (neuropraxia, axonotmese e neurotmese) e de Sunderland (1 a 5).

Figura 6 – Representação esquemática da degeneração Walleriana. Detalhe para a fragmentação do axônio e bainhas de mielina e presença de macrófagos na extremidade distal do axônio.

Figura 7 – Divisão fenotípica dos macrófagos M1 e M2 e suas respectivas vias de atuação.

Figura 8 – Embalagem e frascos do biopolímero heterólogo de fibrina. A: Embalagem (contendo o nome antigo “Selante de Fibrina”). B: Frascos contendo as Frações I, II e diluente.

Figura 9 – Atividade coagulante da gioxina (serino-protease). A e b: Coágulo de fibrina formado após diluição de fibrinogênio com gioxina, mimetizando o BHF. Seta: Detalhe da rede de fibrina.

Figura 10 – Representação esquemática do trajeto e localização anatômica do nervo isquiático em modelo de rato Wistar, posicionado em decúbito ventral com vista da região caudal do membro pélvico após tricotomia. Observa-se sua

ramificação (trifurcação), próxima à altura da fossa poplítea, dando origem aos nervos (lateral para medial) fibular comum, tibial e sural. Detalhe do trocânter maior do fêmur, marco anatômico característico para correta localização do nervo isquiático.

Figura 11 – Fotografias das técnicas cirúrgicas realizadas em todos os grupos experimentais. A e B: Incisão. C: Localização do nervo isquiático (grupo C). D: Neurotmese, inversão e fixação dos cotos proximal e distal (grupo D). E: Detalhe da neurorrafia (grupo S). F: Detalhe da neurorrafia associada ao BHF (grupo SB). Asterisco (*): rede de fibrina formada pelo BHF.

Lista de abreviaturas e siglas

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ANOVA – Análise de variância

BHF – Biopolímero heterólogo de fibrina

C – Grupo Controle

CD – Cluster de diferenciação / grupamento de diferenciação

CD206 – Cluster de diferenciação 206 / Receptor de manose

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CEVAP – Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos

D – Grupo Desnervado

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

FMB – Faculdade de Medicina de Botucatu

HE – Hematoxilina e eosina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IBB – Instituto de Biociências de Botucatu

IFN- γ – Interferon- γ

IL – Interleucina

IROs – Intermediários reativos de oxigênio

JNM – Junção neuromuscular

LNP – Lesão nervosa periférica

LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano

M1 – Macrófagos M1

M2 – Macrófagos M2

MANOVA – Análise de variância multivariada

nAChRs – Receptores nicotínicos de acetilcolina

NGF – Fator de crescimento nervoso

O.C.T – Temperatura ótima de corte

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PBS – Tampão fosfato salino

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

S – Grupo Sutura

SB – Grupo Sutura + Biopolímero de fibrina

SN – Sistema nervoso

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

TLR – Receptor do tipo Toll

TM – Tricrômico de masson

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Unipex – Unidade de Pesquisa Experimental

v – Versão

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de símbolos

% – Porcentagem

® – Marca registrada

h – Horas

HCl – Ácido clorídrico

kg – Kilogramas

m – Metro

M – Molar / mol por litro

mg – Miligramas

min – Minutos

mL – Mililitros

mm – Milímetros

NO – Óxido nítrico

°C – Graus Celsius

p – Probabilidade de significância

pH – Potencial hidrogeniônico

SP – São Paulo

x – Vezes

α – Alfa

γ – Gama

μL – Microlitros

μm – Micrômetros

Sumário

Introdução	17
Justificativa	39
Objetivo	41
Material e métodos	43
Referências	52
Capítulo I (Artigo)	59
Resumo	61
Introdução	62
Material e métodos	64
Resultados	68
Discussão	82
Referências	87
Anexo (Certificado CEUA)	90

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA NERVOSO: CONSTITUIÇÃO GERAL E DIVISÃO ANATÔMICA

O sistema nervoso (SN) pode ser dividido anatomicamente em duas partes: uma parte central, o sistema nervoso central (SNC), e uma parte periférica, o sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é constituído pelo encéfalo e pela medula espinal, enquanto que os nervos, gânglios e terminações nervosas compõem o SNP (Felten *et al.*, 2015; Bear *et al.*, 2020).

O SN é constituído pelo tecido nervoso, uma complexa rede de células altamente especializadas que transmitem sinais elétricos (impulsos nervosos) de e para as diferentes regiões do corpo, coordenando assim todas as suas funções (Hussain *et al.*, 2020).

As células que compõem o tecido nervoso são divididas em dois grupos: neurônios e células da glia. As células da glia incluem, no SNC, oligodendrócitos, astrócitos, micróglias e células ependimárias, e no SNP, células de Schwann e células satélites (anfícitos). Os neurônios são responsáveis pela recepção, transmissão e processamento de estímulos, por meio da geração e condução de impulsos nervosos, enquanto que as células da glia possuem papel de sustentação, defesa e nutrição dos neurônios, fornecendo-os um microambiente adequado (Felten *et al.*, 2015; Bear *et al.*, 2020).

Um neurônio (Figura 1) é constituído por um corpo celular, do qual tem origem os dendritos e o axônio. O corpo celular contém organelas responsáveis pela síntese de macromoléculas e de outros componentes necessários para garantir a estrutura e função do neurônio. Os dendritos são inúmeras ramificações que partem do corpo celular, e realizam diversas sinapses, constituindo a principal área de contato e comunicação dos neurônios. O axônio também tem origem no corpo celular, em uma região denominada cone de implantação, mas diferente dos dendritos, é uma ramificação geralmente única, que se estende por longas distâncias, podendo chegar a mais de 1 m de comprimento (Bear *et al.*, 2020).

Todos os axônios têm um começo (cone de implantação ou cone axônico), um meio (o axônio propriamente dito) e um fim. A extremidade final é denominada terminal nervoso ou botão terminal (Figura 1), é um local onde o axônio entra em

contato com outros neurônios ou outras células, e transmite informações a elas, constituindo as sinapses axônicas (Bear *et al.*, 2020).

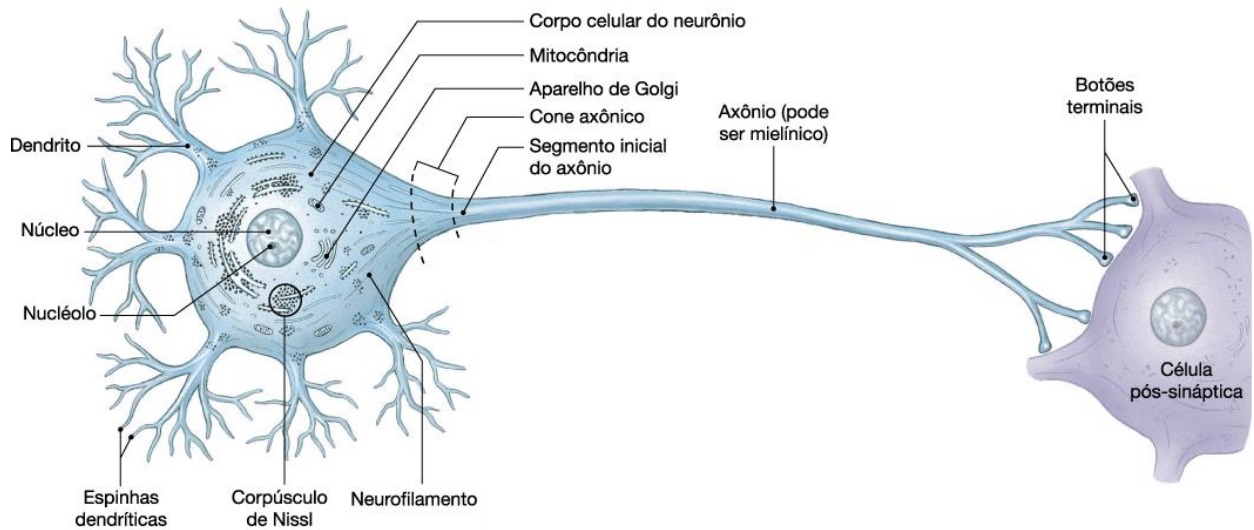


Figura 1: Esquema geral de um neurônio e seus componentes celulares. Adaptado de Martini *et al.* (2009).

Os axônios podem associar-se, no SNP, a células de Schwann, e no SNC, a oligodendrócitos, que emitem projeções da sua membrana plasmática, envolvendo os axônios, e formando as bainhas de mielina. Enquanto um oligodendrócito contribui com mielina para vários axônios, cada célula de Schwann mieliniza apenas um único axônio. A bainha de mielina não se estende continuamente ao longo de todo o comprimento do axônio, há espaços sem mielinização entre as bainhas, chamados de nodos de Ranvier. A distância entre os nodos é geralmente de 0,2 a 2,0 μm , dependendo o tamanho do axônio, sendo que axônios de maior diâmetro possuem distâncias internodais maiores. A mielina associada ao axônio tem como função o isolamento elétrico, visando o aumento da velocidade de condução do impulso nervoso. Os axônios mais o seu envoltório glial são denominados de fibras nervosas, que podem ser mielinizadas ou não (Bear *et al.*, 2020).

O diâmetro de um axônio varia de menos de 1 μm a cerca de 25 μm em humanos. Esta variação é importante, logo que a velocidade de condução do impulso nervoso aumenta com o aumento do diâmetro axonal. Axônios de grande e médio diâmetro (maiores que 1 μm) apresentam bainhas de mielina, enquanto que

os axônios de pequeno diâmetro (menores que 1 μm) são desmielinizados (Felten *et al.*, 2015; Bear *et al.*, 2020).

1.2. SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO: ESTRUTURA E FUNÇÃO

Os nervos são os principais constituintes do SNP, são formados por feixes de fibras nervosas, e associam diferentes partes do corpo ao SNC. Os sinais sensoriais são transmitidos ao SNC por meio das fibras nervosas sensitivas (aférentes), e a resposta gerada é conduzida pelas fibras nervosas motoras (eferentes) até os órgãos-alvo. Assim, uma via de comunicação mútua é estabelecida entre o SNC e áreas periféricas do corpo (Hussain *et al.*, 2020).

Morfologicamente, cada nervo é constituído externamente pelo epineuro (Figura 2A.), uma camada fibrosa de tecido conjuntivo denso que reveste o nervo e envolve os feixes de fibras nervosas, denominados de fascículos nervosos, conferindo resistência e rigidez a estrutura. O epineuro possui um arranjo mais espaçado de fibras colágenas, e ainda inclui tecido adiposo, além de ser vascularizado por capilares fenestrados, ou seja, que possuem orifícios (fenestras) em sua camada de células endoteliais. Cada fascículo nervoso é revestido pelo perineuro (Figura 2B), formado por várias camadas de células robustas, achatadas e justapostas (células perineurais), unidas por junções oclusivas e interpostas por lâmina basal. O perineuro é permeado por pequenos vasos sanguíneos, que irrigam o tecido nervoso, denominados de *vasa nervorum* ou vaso dos nervos, cujas células endoteliais são unidas por junções oclusivas, sendo que o perineuro é uma das camadas que constitui a barreira hematoneural (ou hematonervosa), uma barreira que previne passagem de muitas macromoléculas, sendo um importante mecanismo de defesa contra agentes nocivos. Dentro de cada fascículo encontram-se axônios, cada um envolvido pelas células de Schwann, com sua lâmina basal, e um envoltório de tecido conjuntivo frouxo, o endoneuro (Figura 2C), constituído principalmente por células endoneurais, fibras colágenas, fibras reticulares sintetizadas pelas células de Schwann, além de outros elementos da matriz extracelular. O endoneuro é permeado por capilares sanguíneos que provêm dos *vasa nervorum*, e com isso, suas células endoteliais também formam junções oclusivas impermeáveis, estabelecendo efetivamente a barreira hematoneural (Kerns, 2008; Geuna *et al.*, 2009).

5. References

- ABBADE, L. P. et al. Treatment of chronic venous ulcers with heterologous fibrin sealant: A phase I/II clinical trial. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 83, 2021. ISSN 1664-3224.
- BARRETTE, B. et al. Transcriptional profiling of the injured sciatic nerve of mice carrying the Wld (S) mutant gene: identification of genes involved in neuroprotection, neuroinflammation, and nerve regeneration. **Brain, behavior, and immunity**, v. 24, n. 8, p. 1254-1267, 2010. ISSN 0889-1591.
- BRIGUET, A. et al. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. **Neuromuscular disorders**, v. 14, n. 10, p. 675-682, 2004. ISSN 0960-8966.
- BUCHAIM, D. V. et al. Unique heterologous fibrin biopolymer with hemostatic, adhesive, sealant, scaffold and drug delivery properties: a systematic review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 2019. ISSN 1678-9199.
- CÁMARA-LEMARROY, C. R.; GUZMÁN-DE LA GARZA, F. J.; FERNÁNDEZ-GARZA, N. E. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 5, p. 314-324, 2010. ISSN 1021-7401.
- CAMPBELL, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clinical neurophysiology**, v. 119, n. 9, p. 1951-1965, 2008. ISSN 1388-2457.
- CARRARO, U. et al. Persistent muscle fiber regeneration in long term denervation. Past, present, future. **European journal of translational myology**, v. 25, n. 2, 2015.
- CARTAROZZI, L. P. et al. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. **Brain research bulletin**, v. 112, p. 14-24, 2015. ISSN 0361-9230.
- CATTIN, A.-L. et al. Macrophage-induced blood vessels guide Schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 1127-1139, 2015. ISSN 0092-8674.
- CHEEPUDOMWIT, T. et al. Comparison of cytokine expression profile during Wallerian degeneration of myelinated and unmyelinated peripheral axons. **Neuroscience letters**, v. 430, n. 3, p. 230-235, 2008. ISSN 0304-3940.
- CRUZ, P. M. R. et al. The neuromuscular junction in health and disease: molecular mechanisms governing synaptic formation and homeostasis. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 13, 2020.
- CUNNINGHAM, M. E. et al. Perisynaptic Schwann cells phagocytose nerve terminal debris in a mouse model of Guillain-Barré syndrome. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 25, n. 2, p. 143-151, 2020. ISSN 1085-9489.
- FAULK, D. M. et al. ECM hydrogel coating mitigates the chronic inflammatory response to polypropylene mesh. **Biomaterials**, v. 35, n. 30, p. 8585-8595, 2014. ISSN 0142-9612.
- FERREIRA, R. S. Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice? **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 31, 2014. ISSN 1678-9199.

- FERREIRA, R. S. et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside—an overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 21, 2017. ISSN 1678-9199.
- GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 110, 2011. ISSN 1742-2094.
- HAM, D. J. et al. The neuromuscular junction is a focal point of mTORC1 signaling in sarcopenia. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2020. ISSN 2041-1723.
- HUANG, Z. et al. Skeletal muscle atrophy was alleviated by salidroside through suppressing oxidative stress and inflammation during denervation. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 997, 2019. ISSN 1663-9812.
- HUSSAIN, G. et al. Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 1, p. 116, 2020.
- JOHNSON, R.; WICHERN, D. **others**, **Applied multivariate statistical analysis, vol. 4:** Prentice-Hall New Jersey 2014.
- JONES, S.; EISENBERG, H. M.; JIA, X. Advances and future applications of augmented peripheral nerve regeneration. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1494, 2016.
- LEHRER, G. M.; ORNSTEIN, L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. **The Journal of Cell Biology**, v. 6, n. 3, p. 399-406, 1959. ISSN 0021-9525.
- LEITE, A. P. S. et al. Heterologous fibrin sealant potentiates axonal regeneration after peripheral nerve injury with reduction in the number of suture points. **Injury**, v. 50, n. 4, p. 834-847, 2019. ISSN 0020-1383.
- LIN, T. et al. Hydrogel derived from porcine decellularized nerve tissue as a promising biomaterial for repairing peripheral nerve defects. **Acta biomaterialia**, v. 73, p. 326-338, 2018. ISSN 1742-7061.
- LU, J. et al. Synergistic effects of dual-presenting VEGF-and BDNF-mimetic peptide epitopes from self-assembling peptide hydrogels on peripheral nerve regeneration. **Nanoscale**, v. 11, n. 42, p. 19943-19958, 2019.
- MA, C. H. E. et al. Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 11, 2011. ISSN 0021-9738.
- MAGAZ, A. et al. Bioactive Silk-Based Nerve Guidance Conduits for Augmenting Peripheral Nerve Repair. **Advanced healthcare materials**, v. 7, n. 23, p. 1800308, 2018. ISSN 2192-2640.
- MARQUES, M. J.; CONCHELLO, J.-A.; LICHTMAN, J. W. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 3663-3675, 2000. ISSN 0270-6474.
- MOIMAS, S. et al. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. **Gene therapy**, v. 20, n. 10, p. 1014, 2013. ISSN 1476-5462.

- MULLER, F. L. et al. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. **American journal of physiology-Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 3, p. R1159-R1168, 2007. ISSN 0363-6119.
- NUNES, L.; PACIORNIK, S.; D'ALMEIDA, J. Evaluation of the damaged area of glass-fiber-reinforced epoxy-matrix composite materials submitted to ballistic impacts. **Composites science and technology**, v. 64, n. 7-8, p. 945-954, 2004. ISSN 0266-3538.
- PINTO, C. G. 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**, 2020. ISSN 0020-1383.
- RADUCAN, A. et al. Morphological and functional aspects of sciatic nerve regeneration after crush injury. **Rom J Morphol Embryol**, v. 54, n. 3 Suppl, p. 735-9, 2013.
- SAKAKIMA, H. et al. Effects of short-term denervation and subsequent reinnervation on motor endplates and the soleus muscle in the rat. **Archives of histology and cytology**, v. 63, n. 5, p. 495-506, 2000. ISSN 0914-9465.
- SAKUMA, M. et al. Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. **European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 3, p. 451-462, 2016. ISSN 1460-9568.
- SAQIB, U. et al. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17937, 2018.
- SPEJO, A. et al. Neuroprotection and immunomodulation following intraspinal axotomy of motoneurons by treatment with adult mesenchymal stem cells. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2018. ISSN 1742-2094.
- STRATTON, J. A.; SHAH, P. T. Macrophage polarization in nerve injury: do Schwann cells play a role? **Neural regeneration research**, v. 11, n. 1, p. 53, 2016.
- TUFFAHA, S. H. et al. Growth hormone therapy accelerates axonal regeneration, promotes motor reinnervation, and reduces muscle atrophy following peripheral nerve injury. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 137, n. 6, p. 1771-1780, 2016. ISSN 0032-1052.
- WOLF, M. T. et al. Macrophage polarization in response to ECM coated polypropylene mesh. **Biomaterials**, v. 35, n. 25, p. 6838-6849, 2014. ISSN 0142-9612.
- WU, P. et al. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. **Neural regeneration research**, v. 9, n. 20, p. 1796, 2014.
- ZAR, J. Biostatistical Analysis, 4th Impression, Dorling Kindersley (India) Pvt. **Ltd., Delhi**, v. 110, p. 92, 2009.
- ZIGMOND, R. E.; ECHEVARRIA, F. D. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. **Progress in neurobiology**, v. 173, p. 102-121, 2019. ISSN 0301-0082.