



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

IGOR KUNZE RODRIGUES

**EFEITO DO ANTI-VEGF NA REGENERAÇÃO DO NERVO
MEDIANO DE RATOS WISTAR EM MODELO DE LESÃO POR
ESMAGAMENTO**

TESE DE DOUTORADO

**FLORIANÓPOLIS
2018**

IGOR KUNZE RODRIGUES

**EFEITO DO ANTI-VEGF NA REGENERAÇÃO DO NERVO
MEDIANO DE RATOS *WISTAR* EM MODELO DE LESÃO POR
ESMAGAMENTO**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para obtenção do
grau de Doutor em Ciências
Médicas**

**Área de Concentração: Investigação
biomédica**

**Linha de Pesquisa: Modelos
experimentais em procedimentos
cirúrgicos**

Orientador: Prof. Dr. Armando José d'Acampora

**FLORIANÓPOLIS
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rodrigues, Igor Kunze

Efeito do anti-VEGF na regeneração do nervo mediano de ratos *Wistar* em modelo de lesão por esmagamento / Igor Kunze Rodrigues; orientador, Armando José d'Acampora – Florianópolis, SC, 2018.

136 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Traumatismo de nervo periférico. 3. Lesão por esmagamento. 4. Regeneração nervosa. 5. VEGF. 6. Bevacizumab. I. d'Acampora, Armando José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

IGOR KUNZE RODRIGUES

**“EFEITO DO ANTI-VEGF NA REGENERAÇÃO DO NERVO MEDIANO
DE RATOS WISTAR EM MODELO DE LESÃO POR ESMAGAMENTO”**

Esta tese foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

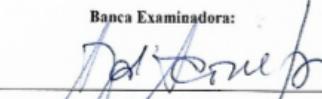
DOUTOR EM CIÊNCIAS MÉDICAS

E aprovada em 05 de dezembro de 2018, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração: **Investigação Biomédica**.

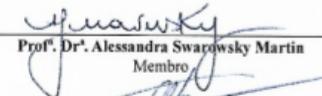


Prof. Dr. Alexandre Sherley Casimiro Onofre
Coordenador do Programa e.c.

Banca Examinadora:



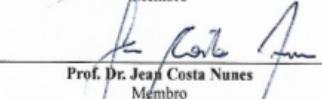
Prof. Dr. Armando Jose D'Acampora
Presidente



Prof. Dr. Alessandra Swarowsky Martin
Membro



Prof. Dr. Alexandre Sherley Casimiro Onofre
Membro



Prof. Dr. Jean Costa Nunes
Membro

Florianópolis, 2018

Aos meus queridos pais, Ricardo e Valdete, cujos esforços e dedicação de uma vida prioritariamente voltada ao cuidado dos filhos permitiram a construção dos alicerces para a minha formação educacional e moral.

À minha esposa Carolina, meu porto seguro, por seu carinho, respeito, dedicação, amor e principalmente compreensão nos períodos aos quais eu estive ausente.

Amo vocês incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

À UFSC, minha instituição *alma mater*, que promoveu minha sólida formação, baseada no tripé técnico, científico e humanístico, que visa ao serviço da sociedade. A trilogia teve seu início na Graduação em Medicina, seguiu-se com a conclusão do Mestrado Acadêmico e agora encerra este ciclo com o término do Doutorado. Dentre os personagens-chaves que se destacam neste terceiro capítulo de minha formação, gostaria de agradecer, em especial:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Armando José d'Acampora (professor aposentado do Departamento de Clínica Cirúrgica), um dos notáveis no estudo experimental da Faculdade de Medicina desta instituição, por acreditar na minha capacidade e na potencialidade deste estudo, mas essencialmente por permitir liberdade criativa desde o início do projeto;

Ao Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (vinculado ao Departamento de Ciências Fisiológicas e líder do grupo em pesquisa do laboratório LANDI), pela amizade em oferecer o laboratório para realização de grande parte dos experimentos e fundamentalmente pelos ensinamentos para solidificar minha formação como um pesquisador;

À Prof. Dra. Elisa Cristina Winkelmann Duarte (pertencente ao Departamento de Ciências Morfológicas), pelo interesse, dedicação e preocupação durante a confecção de todas as etapas do trabalho;

Ao Prof. Dr. Edevard José de Araújo (do Departamento de Clínica Cirúrgica e coordenador do laboratório da TOCE), pelos conselhos e orientações sempre pertinentes nos momentos difíceis e ser uma inspiração na carreira ao Magistério Superior na Área Médica;

À equipe do LANDI (mestrandos e doutorandos) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFSC: Jhenifer Karvat, Bárbara Beatriz Philippi Martins, Sheila Iria Kraus, Fernando da Silva Fiorin, pelo incentivo e amizade e pelas palavras positivas diante das inúmeras dificuldades que ocorreram neste período... em especial à Jhenifer e à Bárbara, por participarem de forma ativa durante as fases dos experimentos... vocês foram incríveis;

Ao Dr. Paulo Roberto Kechele, cuja formação também ocorreu nesta escola, por ser o motivador inicial na realização deste trabalho;

Aos funcionários da TOCE: Alexandre dos Passos (“Faísca”), Carlos Alberto Joaquim, Maico Oliveira Buss, Sérgio Silveira Coelho, Mário César Ferreira, pela amizade e colaboração;

Aos técnicos do Laboratório de Histologia da UFSC: Gilberto Domingos Marioch, Elisabete Mari da Silveira (“Bel”) e Manoel Jorgino da Silveira (“Maneca”), pelos bons conselhos e pelo assessoramento irrestrito ao trabalho;

Ao grupo de Patologia do HU/UFSC, em especial à Prof. MSc. Daniela Serafin Couto Vieira (Departamento de Patologia), à residente em Patologia Ana Carolina Moraes Brandão Rodrigues e aos técnicos de Patologia desta Unidade, particularmente José Antônio Correa (“Dudu”), pela atenção e disponibilidade em sempre ajudar na confecção e interpretação dos resultados;

Ao Setor de Laboratório do HU/UFSC, em especial à Prof. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva (do Departamento de Análises Clínicas e coordenadora do laboratório do HU) e a valorosa funcionária Maria Aparecida Rosa Cunha Cordeiro (“Cida”), por sempre estarem disponíveis no auxílio técnico bem como pelo compartilhamento do freezer -80°C, para conservação das amostras;

Ao Prof. Dr. Carlos Rodrigo de Mello Roesler (associado ao Departamento de Engenharia Mecânica e líder do Laboratório de Engenharia Biomecânica - LEBm) e ao doutorando Otávio Teixeira Pinto, vinculado ao laboratório GRANTE, pela parceria e auxílio técnico;

A todos os membros do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, em especial à Sra. Grasiela Cipriani e ao Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, pela amizade e conselhos nos momentos de adversidade... e ao Prof. Alexandre e demais membros do corpo docente do PPG-CM pelos ensinamentos;

Aos colegas da pós-graduação, do PPG-CM da UFSC com quem tive a satisfação de conviver neste período, em especial a Humberto Fenner Lyra Jr. pela parceria e amizade;

À cooperação estabelecida entre a UFSC e à Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Estado de Santa Catarina, por meio do CEPON, que promoveu a doação das sobras do fármaco utilizado nos experimentos. Para tanto, foi essencial a colaboração e disponibilidade das funcionárias do Setor de Farmácia e Diluição do CEPON Caroline Weiner; Tatiana de Bem de Luca; Fabiana Magalhães; Elinara Vitorino; Cleide Rosa;

Aos que se foram nesta jornada: Srs. Luiz Henrique Prazeres (Laboratório de TOCE) e Luiz Carlos Peixoto (Laboratório de Anatomia e Histologia)... obrigado pela amizade... encontraremos-nos um dia!

E a todos que diretamente ou indiretamente participaram deste projeto e não foram citados, mas que permitiram a concretização deste sonho: meus sinceros agradecimentos... todos foram muito especiais!
Afinal, como revela o soneto do genial poeta baiano Gregório de Matos Guerra, expoente maior da Escola Barroca brasileira:

“O todo sem a parte não é o todo / A parte sem o todo não é parte / Mas se a parte o faz todo, sendo parte / Não se diga, que é parte, sendo todo [...]”

(GUERRA, Gregório de Matos, in: *Ao Braço do Mesmo Menino Jesus Quando Apareceu* [1683-1695?])

Vocês todos fizeram a diferença para o sucesso deste trabalho!

Para concluir: aos animais que se sacrificaram para o progresso da ciência e...

A Deus, o arquiteto de tudo... o princípio e o fim.

“Es gibt keine ewigen Tatsachen: so wie es keine absoluten Wahrheiten gibt.”

(Não há fatos eternos, assim como não há verdades absolutas.)

Friedrich Wilhelm Nietzsche

“I haven’t failed. I’ve just found 10,000 ways that won’t work.”

(Eu não falhei. Eu apenas descobri 10.000 maneiras que não funcionam.)

Thomas Alva Edison

“In the middle of difficulty, lies opportunity.”

(No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.)

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: Lesões por quedas são frequentes em pacientes oncológicos. As neuropatias secundárias ao trauma apresentam crescente aumento nessa população. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha reconhecido efeito no desenvolvimento e proteção neurais, enquanto os seus inibidores estão se destacando como agentes antineoplásicos.

Objetivo: Avaliar o efeito do bevacizumab (BEV), um inibidor de VEGF, na regeneração do nervo mediano de ratos *Wistar* submetidos à lesão por esmagamento.

Métodos: Estudo experimental, randomizado, duplo-cego que utilizou 132 ratos machos, da linhagem *Wistar*, com peso médio de 250-300g e idade entre 12 e 14 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil. Empregou-se o modelo experimental de lesão por esmagamento do nervo mediano. A aplicação de BEV em 2 doses (10 e 20 mg/kg) neste modelo foi comparada com controle operado (NaCl 0,9%) e *shams* (NaCl 0,9% e BEV 20 mg/kg). Realizou-se avaliação da regeneração nervosa por teste de prensão; parâmetros histológicos e análise das concentrações do VEGF no tecido nervoso. Procedeu-se análise estatística por ANOVA de 1 e 2 vias, com pós-teste de Dunnett ou Tukey, respectivamente, utilizando-se o programa *Prism 6.07*[®] (*La Jolla, CA, EUA*).

Resultados: Não ocorreu diferença na significância estatística entre os grupos NaCl 0,9% e bevacizumab submetidos a lesão do nervo mediano por esmagamento nos teste de prensão; diâmetros do nervo e fibras axonais mielinizadas; concentrações de VEGF.

Conclusão: Bevacizumab não implica em piora da função neurológica em animais submetidos à lesão tipo esmagamento de nervo.

Descritores: Traumatismo do nervo periférico. Lesão por esmagamento. Regeneração nervosa. VEGF. Bevacizumab.

ABSTRACT

Background: Falls injuries are common in oncological patients. Neuropathies secondary to trauma show a growing increase in this population. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) has been recognized to play a role in neural development and protection, while its inhibitors have been stood out as antineoplastic agents.

Objective: This work aims to evaluate the effect of bevacizumab (BEV), a VEGF inhibitor, in the median nerve regeneration of *Wistar* rats submitted to crush injury.

Methods: A randomized, double blind study using 132 *Wistar* male rats, with a mean weight of 250-300g and age between 12 and 14 weeks, from the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Brazil. It was used the experimental model of lesion by median nerve crush. BEV application in 2 doses (10 and 20 mg / kg) in this model were compared with operated control (NaCl 0.9%) and *shams* (NaCl 0.9% and BEV 20 mg / kg) groups. Nerve regeneration was evaluated by: grasping test; histological parameters and analysis of VEGF concentrations in nerve tissue. Statistical evaluation among the groups was obtained by 1-way and 2-way ANOVA, with either Dunnett or Tukey *post-test*, respectively, using the Prism 6.07® software (La Jolla, CA, USA).

Results: There were not statistically significant differences in the grasping test; nerve diameters and myelinated axonal fibers; concentrations of VEGF among NaCl 0.9% and bevacizumab groups submitted to median nerve crush injury.

Conclusion: Bevacizumab does not lead to worsening of neurological function in animals submitted to nerve crush injury.

Keywords: Peripheral nerve injury. Crush injury. Nerve regeneration. VEGF. Bevacizumab.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Secção transversal do nervo mediano de rato demonstrando sua arquitetura	35
Figura 2	Relação das estruturas vículo-nervosas na região cubital do rato	37
Figura 3	Exemplo de axoniotmese	39
Figura 4	Fluxograma ilustrativo do delineamento principal da pesquisa	49
Figura 5	Procedimento na fossa cubital do animal	53
Figura 6	Teste de resposta funcional	54
Figura 7	Avaliação histopatológica	55
Figura 8	Análise bioquímica	56
Figura 9	Avaliação temporal da força intergrupos no teste de preensão	59
Figura 10	Avaliação temporal da força intragrupos no teste de preensão	60
Figura 11	Secção transversal de nervo mediano de rato 3 dias após esmagamento	64
Figura 12	Secção transversal de nervo mediano de rato 21 dias após esmagamento	65
Figura 13	Avaliação temporal da concentração de VEGF intergrupos	66
Figura 14	Ensaio calibrado da força exercida em cada cremalheira pelo porta-agulhas	95
Figura 15	Representação da ponte de Wheatstone	97
Figura 16	Esquema ilustrativo de extensômetro utilizado na calibração do instrumental	98
Figura 17	Gráfico tensão-deformação obtido a partir do ensaio calibrado do porta-agulhas	98
Figura 18	Comprovação de aprovação do projeto de pesquisa à CEUA	101
Figura 19	Comprovação de exposição de trabalho em Congresso	102
Figura 20	Comprovação de submissão do primeiro artigo à revista científica	103
Figura 21	Comprovação de submissão do segundo artigo à revista científica	104

LISTA DE QUADRO E TABELAS

I – LISTA DE QUADRO

Quadro 1	Classificação de Seddon e Sunderland para lesão de nervo periférico	38
-----------------	---	-----------

II – LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos animais para avaliação comportamental e histológica	50
Tabela 2	Distribuição dos animais para avaliação bioquímica	50
Tabela 3	Parâmetros histomorfométricos intergrupos nos 3° e 21° dias	62
Tabela 4	Comparação da concentração média de VEGF em cada intervalo de tempo	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

I – ABREVIATURAS E SIGLAS GERAIS

a.(a.)	artéria(s)
ANOVA	análise da variância
ARRIVE	Pesquisa Animal: Relato de Experimentos <i>In Vivo</i> ; acrônimo em inglês de <i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
BEV	bevacizumab
BHE	barreira hematoencefálica
BHN	barreira hematoneural
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CE	células endoteliais
CEPON	Centro de Pesquisas Oncológicas
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CFS	Departamento de Ciências Fisiológicas
CLC	Departamento de Clínica Cirúrgica
CO ₂	dióxido de carbono
CSs	células de <i>Schwann</i>
CTC	Centro de Ciências Tecnológicas
d	diâmetro da fibra nervosa
D	diâmetro do nervo
D/d	razão diâmetro nervo/diâmetro da fibra nervosa
DM	<i>diabetes mellitus</i>
DRG	gânglio da raiz dorsal
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
EMC	Departamento de Engenharia Mecânica
EUA	Estados Unidos da América
GAP 43	proteína associada ao crescimento 43
GRANTE	Grupo de Análise e Projeto Mecânico
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HE	hematoxilina-eosina
HSPGs	proteoglicanos de heparan sulfato
IgG1	subclasse 1 da imunoglobulina G
IM	intramuscular
IP	intraperitoneal
IV	intravenoso
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

LANDI	Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
LRQ	lesões relacionadas a quedas
LTNP	lesões traumáticas de nervos periféricos
m.(m.)	músculo(s)
ME	microscópio eletrônico
MEC	matriz extracelular
ML	microscópio de luz
MOR	Departamento de Ciências Morfológicas
n.(n.)	nervo(s)
NaCl 0,9%	solução de cloreto de sódio a 0,9%
NF2	neurofibromatose do tipo 2
NMI	neurônios motores inferiores
NPIQ	neuropatia periférica induzida por quimioterapia
NRP	coreceptor de TRK neuropilina
Op BEV10	grupo cirurgia para esmagamento do nervo com solução de droga bevacizumab a 10 mg/kg
Op BEV20	grupo cirurgia para esmagamento do nervo com solução droga de bevacizumab a 20 mg/kg
Op NaCl 0,9%	grupo cirurgia para esmagamento do nervo com solução de salina isotônica (NaCl 0,9%)
PTL	Departamento de Patologia
PVPI	iodopovidona
QT	quimioterapia
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro (RNA mensageiro)
RTK	receptor de tirosina quinase
SES/SC	Secretaria de Estado da Saúde do Estado de Santa Catarina
Sh BEV20	grupo <i>sham</i> com solução droga bevacizumab a 20 mg/kg
Sh NaCl 0,9%	grupo <i>sham</i> com solução salina isotônica (NaCl 0,9%)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
STAR	Relatórios Estruturados, Transparentes, Acessíveis; acrônimo em inglês de <i>Structured, Transparent, Accessible Reporting</i>
TCE	traumatismo cranioencefalico
TOCE	Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-R	receptor de VEGF

II – SIGLAS DE GRANDEZAS FÍSICAS E UNIDADES DE MEDIDAS INTERNACIONAIS COM SUAS CORRELAÇÕES

II.1 – Grandezas Físicas

E	módulo de elasticidade de Young
F	força
i	corrente elétrica
k	constante da mola
R	resistência elétrica
t	tempo
U	diferença de potencial elétrico (ddp)
Δl	deslocamento
ϵ	deformação elástica do corpo de prova
σ	tensão aplicada sobre o corpo de prova

II.2 - Unidades de Medida

cm	centímetro (10^{-2} m)
cm ²	centímetro quadrado (10^{-4} m ²)
g	grama (10^{-3} kg)
g.f	grama-força ($9,80665 \cdot 10^{-3}$ N; 10^{-3} Kg.f)
h	hora (60 min; 3600 s)
kg	quilograma (10^3 g)
kg.f	quilograma-força (9,80665 N)
m	metro (10^2 cm; 10^3 mm)
m ²	metro quadrado (10^4 cm ² ; 10^6 mm ²)
mg	miligrama (10^{-3} g; 10^{-6} kg)
ml	mililitro (10^{-3} l)
mm	milímetro (10^{-3} m)
mm ²	milímetro quadrado (10^{-6} m ²)
Mpx	megapixel (10^6 pixels)
N	Newton (1 kg.m/s^2 ; 10^5 g.cm/s^2 ; 10^5 dyn)
Pa	Pascal (1 N/m^2 ; 10^{-5} bar; $9,87 \cdot 10^{-6}$ atm; $7,5 \cdot 10^{-3}$ torr; $145 \cdot 10^{-6}$ psi)
pg	picograma (10^{-12} g; 10^{-15} kg)
s	segundo ($1,66667 \cdot 10^{-2}$ min; $2,77778 \cdot 10^{-4}$ h)
μm	micrômetro (10^{-6} m; 10^{-4} cm; 10^{-3} mm)
μm^2	micrômetro quadrado (10^{-12} m ² ; 10^{-8} cm ² ; 10^{-6} mm ²)

LISTA DE SÍMBOLOS

=	é igual a
≠	não é igual a; é diferente de
<	é menor que
≤	é menor ou igual a
+	mais
±	mais ou menos
^x ou •	multiplicado por
≈	aproximadamente
⇒	isto implica; se ... então
∴	portanto; logo
%	porcento
*	valor de significância menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$)
**	valor de significância menor ou igual a 1% ($p \leq 0,01$)
***	valor de significância menor ou igual a 0,1% ($p \leq 0,001$)
****	valor de significância menor ou igual a 0,01% ($p \leq 0,0001$)
®	marca registrada
“	polegada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1.1 - CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA	29
1.1.1 - A queda como trauma de nervo na população oncológica ..	29
1.1.2 - O uso do antagonista de VEGF em pacientes oncológicos ..	30
1.2 - A REGENERAÇÃO EM TRAUMA DE NERVO PERIFÉRICO	32
1.2.1 - Conceitos morfológicos	33
1.2.2 - Classificação das lesões no nervo periférico	37
1.2.3 - Fisiopatologia da lesão ao nervo periférico	39
1.2.4 - Papel do VEGF na regeneração do nervo periférico	43
2. OBJETIVOS	45
2.1 – GERAL	45
2.2 – ESPECÍFICOS	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4. RESULTADOS	59
4.1 - FUNCIONAL (TESTE DE PREENSÃO)	59
4.2 - MORFOLÓGICOS (HISTOMORFOMÉTRICO E QUALITATIVO) .	61
4.3 - BIOQUÍMICO (CONCENTRAÇÃO DE VEGF)	66
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	81
6.1 – GERAL	81
6.2 – ESPECÍFICAS	81
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE	95
PROTOCOLO DE CALIBRAÇÃO DE INSTRUMENTAL	95
ANEXOS	101
A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	101
B - Comprovante de Submissão de Trabalho em Congresso	102
C - Comprovante de Submissão do Artigo Científico 1	103
D - Comprovante de submissão do Artigo Científico 2	104
E - Artigo científico 1 (versão língua inglesa)	105
F - Artigo científico 2 (versão língua inglesa)	119

1. INTRODUÇÃO

1.1 - CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

1.1.1 - A QUEDA COMO TRAUMA DE NERVO NA POPULAÇÃO ONCOLÓGICA

As lesões traumáticas de nervos periféricos (LTNP) constituem uma das principais causas de incapacidade física no mundo. Um problema importante e que leva à LTNP, porém muitas vezes negligenciado, é aquele trauma decorrente de quedas. Entretanto, em virtude do aumento crescente da expectativa de vida da população, torna-se um tema atual e relevante, o que faz merecer a preocupação dos órgãos de saúde ¹⁻³. Neste cenário, estima-se que as quedas levem a gastos de saúde de aproximadamente US \$ 17.000 por evento ⁴ e que, até 2020, custarão ao sistema de saúde dos Estados Unidos da América (EUA) quase US \$ 55 bilhões ⁵. A maioria destas LTNP envolveu danos aos nervos das extremidades superiores ⁶⁻⁷, resultando em comprometimento da função sensorial e motora dos segmentos braço, antebraço e mão ⁷.

Na população idosa, em especial, apresentam-se como um agravo em grande parte subnotificado e fonte de significativa morbidade, uma vez que 16% da população estaduniense que apresenta mais de 65 anos sofre uma queda a cada 3 meses ⁶. No Brasil, estudos sobre a prevalência anual de quedas entre idosos variaram de 28,1 a 37,5% ⁸⁻⁹, destacando que 16,5% apresentaram duas ou mais quedas ⁹ e destas, a maioria ocorreu na própria residência da pessoa ⁸. Esta faixa etária essencialmente apresenta diminuições da densidade óssea e da massa muscular. Este fenômeno predispõe a quedas bem como expõem seus nervos a um maior risco de lesões decorrentes de fraturas do esqueleto apendicular ⁶. Soma-se ao fato que este grupo populacional singularmente também é acometido por doenças crônicas como *diabetes mellitus* (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS), doenças neurodegenerativas e, principalmente, neoplasias.

Dentre os pacientes oncológicos, um evento particularmente comum é o desenvolvimento de neuropatia periférica. Esta pode ser decorrente de neuropatias paraneoplásicas, imunomediadas ou neoplásicas, porém, são mais frequentemente causadas por agentes quimioterápicos neurotóxicos, a chamada Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterapia (NPIQ) ¹⁰. Desse modo, a quimioterapia (QT) é

notoriamente um fator de risco para queda nesse estrato populacional ⁵. Esta percepção está em consonância com dados que revelam ser cerca de 50% a probabilidade de queda na população idosa com câncer avançado, sendo que este episódio estaria associado a um alto risco de morbidade e mortalidade ¹¹. Cabe destacar que as quedas em idosos que apresentam neoplasia podem ser mais comuns quando comparadas à população geral de adultos idosos. Assim, naquele segmento geriátrico há um aumento de 16 a 17% no risco de quedas ⁵, tendo a NPIQ um papel de destaque nesse fenômeno.

Neste sentido, no intuito de minimizar os efeitos adversos (dentre eles a neuropatia e suas conseqüências secundárias) e aumentar a eficácia dos agentes citotóxicos tradicionais usados em QT, desenvolveram-se terapias alvo como novas opções para o tratamento dos tumores sólidos. Entre estas novas terapias, aquelas que envolvem a antiangiogênese, ao inibir o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), apresentam crescente destaque, sendo atualmente uma estratégia biológica bem estudada para diversos tipos de neoplasias. A importância destes novos agentes pode ser evidenciada pelo fato de existir um risco significativamente maior de lesões traumáticas relacionadas a quedas (LTRQ) nos pacientes que receberam QT neurotóxica dupla em comparação com aqueles ao qual foi administrado um único agente deste tipo ou então a uma droga não neurotóxica, como é o caso desse agente antiangiogênico ¹².

1.1.2 - O USO DO ANTAGONISTA DE VEGF EM PACIENTES ONCOLÓGICOS

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e seus receptores controlam rigidamente processos como vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento de vasos sanguíneos ¹³. Do mesmo modo, o VEGF também desempenha função importante em outros órgãos e sistemas, incluindo sistema nervoso central (SNC), rim, pulmão e fígado, onde ele influencia diretamente no funcionamento e desenvolvimento destes órgãos ¹⁴. Nos mamíferos, a família do VEGF é composta por cinco membros, denominados VEGF-A, -B, -C, -D e fator de crescimento da placenta (PGF). Interessante salientar que o VEGF apresenta a capacidade de simultaneamente ligar-se a vários tipos de proteínas transmembranas, que medeiam os efeitos biológicos do VEGF. Estas incluem os receptores de tirosina quinase (RTK) do VEGF denominados VEGF-R1 ao 3 (Flt1; Flk1/KDR; Flt4) bem como os

correceptores da família neuropilina tipo 1 e 2 (NRP1 e NRP2). Há ainda várias proteínas de ligação auxiliares que desempenham um papel crítico no processo de angiogênese e que apresentam relação com VEGF, como integrinas, efrina B2 e os proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs) ¹⁴. A partir deste conhecimento, estudos bioquímicos e de cultura de células mostraram que os VEGF-A e B e o PGF se ligam ao VEGF-R1, enquanto o VEGF-R2 apresenta ligação com o VEGF-A. Já os VEGF-C e D se conectam ao VEGF-R3 (e após processamento proteolítico também ao VEGF-R2) ¹³.

Dentre os membros da família VEGF, aquele que apresenta maior evidência, indubitavelmente, é o VEGF-A. Sabe-se que há múltiplas isoformas do VEGF-A, que são decorrentes do processamento (*splicing*) alternativo dos exons 6 e 7 do gene do VEGF no cromossomo 6p21.1 ¹⁵. Estas foram originalmente descritas como VEGF121, VEGF165, VEGF189 e VEGF206 ¹⁵. Entretanto, há relatos de outras variantes menos comuns, incluindo VEGF145 e VEGF183. Basicamente, a principal diferença entre estas isoformas é a sua afinidade pela heparina ¹⁵. Dentre todas estas, o VEGF165 se destaca por ser a mais comumente expressa em tecidos normais, bem como em células tumorais. Além disso, esta isoforma apresenta um comportamento intermediário entre o VEGF121, que é altamente difusível e o VEGF189, que se apresenta fortemente ligado à matriz extracelular (MEC). Outrossim, há relatos de isoformas inibidoras do VEGF-A, conhecidas como VEGF 165b e VEGFAx. Contudo, estudo recente demonstrou que na realidade estas apresentam efeitos agonistas fracos proangiogênicos (mitogênicos) e não os inibitórios que outrora se acreditava ¹⁵. Enfatiza-se, portanto, que o VEGF-A desempenha um papel notável na promoção do crescimento de células endoteliais, na regulação da permeabilidade vascular e na vasodilatação, bem como na indução da migração endotelial, o que o torna um regulador chave da angiogênese tumoral ¹⁶. Este fato motivou nos últimos anos o interesse no desenvolvimento de pesquisas com drogas que interajam com este fator de crescimento, com inegável destaque para o bevacizumab (BEV).

O bevacizumab é um anticorpo monoclonal da subclasse 1 da imunoglobulina G (IgG1) humanizado recombinante que se liga ao fator de crescimento endotelial vascular humano A (VEGF-A) e, conseqüentemente, inibe sua interação com os receptores no órgão-alvo ¹⁶⁻¹⁸. O medicamento tem seu uso aprovado atualmente para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células avançado ¹⁹⁻²⁰; tumor colorretal metastático ²¹⁻²³; neoplasia maligna de células renais metastático ²⁴⁻²⁵; câncer de ovário epitelial recidivante

resistente à platina ²⁶⁻²⁸; tumor maligno peritoneal primário ²⁸ e câncer de mama metastático ²⁹⁻³⁰. Entretanto é importante destacar que a indicação específica pode variar em cada região, conforme a Agência Reguladora de Saúde de cada país ¹⁷⁻¹⁸.

Em relação aos tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) e Periférico (SNP), o fármaco apresenta resultados controversos em lesões gliais de alto grau, cuja terapia combinada não proporcionou uma vantagem de sobrevida com o seu uso ³¹⁻³². Não obstante, no caso de tumores do nervo periférico e schwannomas vestibulares, alguns grupos relatam melhora funcional em modelos experimentais e até em humanos após o uso desta droga. Acredita-se, porém, que isto estaria relacionado ao efeito indireto na melhora de perfusão e edema do tecido acometido ³³⁻³⁴. Neste cenário sobressai-se uma recente diretriz de nível 3 com a recomendação de que o BEV seja administrado apenas para reduzir ou estabilizar radiologicamente o tumor; melhorar a audição ou prolongar o tempo até a perda auditiva em pacientes com neurofibromatose do tipo 2 (NF2) e sem opções cirúrgicas ³⁵.

Geralmente, o BEV é uma droga bem tolerada, sendo que sua toxicidade normalmente não é sobreposta àquela dos quimioterápicos citotóxicos ³⁶. Os efeitos colaterais mais frequentes deste agente são a HAS e a hemorragia. Este último é particularmente importante se considerarmos a possibilidade de eventos traumáticos na população oncológica decorrentes de quedas. Apesar disso, os eventos neurológicos adversos são considerados como sendo efeitos secundários à administração deste medicamento. Dentre estes, destacam-se como maiores complicações neurológicas imediatas ao uso de BEV: cefaleia, episódios cerebrovasculares e síndrome da encefalopatia leucocitária reversível ³⁶. Além destes conhecidos efeitos antiangiogênicos do bevacizumab, a inibição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) promove ainda repercussões imunomodulatórias ³⁷. Especialmente em pacientes oncológicos, esta modulação é evidenciada por meio de sua ação em células leucocitárias deste estrato populacional. Por conseguinte, poderia produzir impactos nestas células que atuam na resposta inflamatória, como naquela vinculada ao processo de lesão e regeneração decorrente do trauma no nervo periférico.

1.2. - A REGENERAÇÃO EM TRAUMA DE NERVO PERIFÉRICO

A condução de casos de pacientes com trauma de nervo periférico exige o conhecimento de aspectos morfológicos e fisiopatológicos envolvidos

nos fenômenos que se seguem após a lesão do nervo periférico. Neste sentido, realizou-se uma breve revisão de Anatomia (macroscópica e microscópica), assim como de Patologia do Sistema Nervoso Periférico (SNP), na qual é evidenciada a importância do VEGF neste processo regenerativo.

1.2.1 – CONCEITOS MORFOLÓGICOS

1.2.1.1 - Aspectos Histológicos Gerais

Os nervos periféricos são estruturas heterogêneas constituídas por fibroblastos, células inflamatórias (particularmente macrófagos), células de *Schwann* e neurônios³⁸. Estes últimos são estruturas polarizadas responsáveis pela condução nervosa e que, dessa forma, são os componentes chaves na constituição dos nervos. Estas células são compostas por dendritos, corpo celular (soma) e axônio. Este prolongamento unitário se projeta em direção aos seus locais de inervação, onde forma sinapses com o órgão-alvo. O início deste processo fisiológico tem sua origem em uma região única de implantação no corpo celular chamada cone axonal, que também é responsável pela geração inicial do potencial de ação³⁸. Consequentemente, a fibra nervosa é considerada a menor unidade morfofuncional de um nervo periférico. As fibras são agrupadas em fascículos nervosos, que no Sistema Nervoso Periférico (SNP) compõem o nervo.

Particularmente no SNP alguns axônios (geralmente aqueles acima de 1,5 mm de diâmetro) podem estar envolvidos por uma bainha lipídica de mielina que é produzida pelas células de *Schwann*³⁹. A mielina age como um isolante, permitindo a condução rápida e eficiente deste potencial de ação gerado³⁸. Aquelas fibras nervosas que não foram mielinizadas são compostas por vários axônios envolvidos como um estojo, por uma única célula de *Schwann*. Por sua vez, naquelas fibras que se apresentam mielinizadas, o território da célula de *Schwann* define um internódio. Este é separado por intervalos regulares desmielinizados, denominados nós de *Ranvier*³⁹. Assim, como se pode observar, esta bainha é descontínua, de modo que o comprimento internodal varia diretamente com o diâmetro de suas fibras (de 150 a 1.500 mm). Nota-se ainda, nas fibras mielinizadas normais, a presença de interrupções oblíquas ao longo da mielina interparanodal às quais a compactação da membrana é perdida, que são chamadas de incisões de *Schmidt-Lanterman*³⁹. Neste sentido, baseado no conceito de mielinização, as

fibras do Sistema Nervoso podem ser divididas em mielínicas ou não-mielínicas.

Estas delicadas estruturas necessitam de proteção e resistência frente às forças de estiramento e compressão que ocorrem durante o contínuo movimento do corpo, bem como a eventuais traumas que podem acometer estes órgãos. Para este fim, há um arcabouço de tecido conectivo, que envolve os axônios, as células da glia e os troncos nervosos, uni ou multifasciculares no SNP (**Figuras 1A e 1B**). Deste modo, circundando o nervo espinal, existe o epineuro. Já os fascículos individuais são envolvidos por um perineuro de várias camadas e, finalmente, abraçando a fibra nervosa, existe o endoneuro ³⁹ (**Figuras 1A e 1B**).

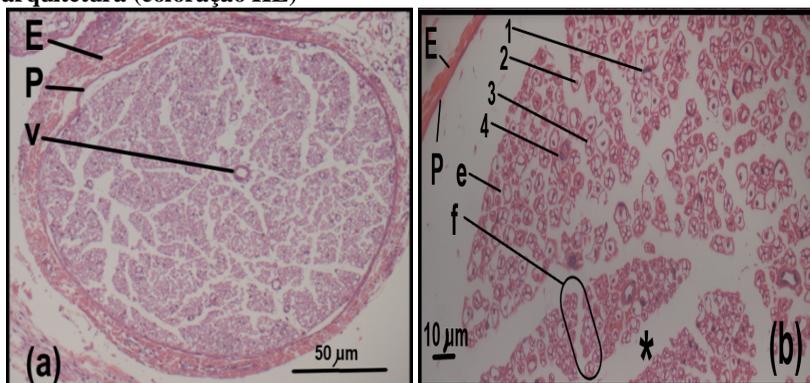
O Epineuro é, portanto, a camada mais externa do tecido conjuntivo de suporte e proteção que envolve todo o nervo periférico (**Figuras 1A e 1B**). Embriologicamente esta estrutura é derivada do mesoderma sendo que, em humanos, o epineuro normalmente constitui cerca de 30 a 70% da área transversal total do feixe nervoso ³⁹. Este tecido é composto por fibroblastos, colágeno (tipos I e II) e quantidades variáveis de lipídeos, o que parece garantir uma função protetiva ao nervo ³⁹. O epineuro envolve numerosos fascículos nervosos, vasos sanguíneos, linfócitos e fibroblastos ⁴⁰ sendo atravessado pela *vasa nervorum*, que se comunica com uma rede de arteríolas e vênulas dentro do endoneuro ⁴⁰.

Já o perineuro (**Figuras 1A e 1B**) é a camada intermediária que envolve cada fascículo nervoso. Apresenta-se como um tecido conjuntivo de múltiplas camadas (7 a 15) concêntricas alternadas, constituídas por células poligonais achatadas e colágeno ³⁹⁻⁴⁰. Estas células perineurais são também chamadas de células mioepiteliais, uma vez que apresentam capacidade de contração e presença de junções celulares ³⁹. Cada camada celular é envolvida por uma lâmina basal, sendo que existem espaços entre estas camadas onde se acomodam capilares, fibras de colágeno e fibrilas elásticas. Todas estas características tornam o perineuro elástico e resistente a certos danos mecânicos ⁴⁰. Destaca-se ainda em sua composição a presença de numerosas vesículas pinocitóticas e frequentemente feixes de microfilamentos. Estes achados, associado ao fato de que as células do perineuro serem ricas em enzimas de fosforilação, trazem a ideia de que o perineuro funcionaria também como uma barreira de difusão metabolicamente ativa ³⁹.

Por sua vez, o endoneuro (tubo endoneural, canal endoneural ou bainha de Henle) (**Figura 1B**) é a camada mais interna ⁴⁰ deste arcabouço. Envolve um grupo de pequenas fibras nervosas não mielinizadas ou

mais comumente, a bainha de mielina de cada fibra nervosa mielinizada. Apresenta-se como uma estrutura colagenosa frouxa com presença de grandes espaços extracelulares. Esta matriz contém fibroblastos, macrófagos, mastócitos, fibras de colágeno, mucopolissacarídeos e uma rede capilar. A maioria da população celular do endoneuro é constituída por células de *Schwann* e células endoteliais, enquanto os fibroblastos representam apenas 4% deste total ⁴⁰.

Figura 1 - Secção transversal do nervo mediano de rato demonstrando sua arquitetura (coloração HE)



FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: E = epineuro; P = perineuro; e = endoneuro; v = vaso; f = fascículo; 1 = célula de Schwann; 2 = axônio; 3 = bainha de mielina; 4 = célula endotelial; asterisco = trave do perineuro.

NOTAS: (a) magnificação de 100x; (b) magnificação de 400x.

As células de *Schwann* (**Figura 1B**) envolvem axônios em múltiplas camadas, formando a bainha de mielina e, portanto, garantem proteção e isolamento estrutural. Por outro lado, os vasos endoneurais (**Figura 1B**) constituem uma fina rede capilar que fornece suprimento de oxigênio e nutrientes. Estas células endoteliais nos vasos endoneurais também formam uma barreira física chamada barreira hematoneurótica (BHN), que mantém a homeostasia do espaço endoneural ⁴⁰. É importante ressaltar que estes componentes fibrosos e celulares do endoneuro são banhados por um líquido endoneural. Em condições fisiológicas, a pressão do fluido endoneural é ligeiramente maior que a do epineuro circundante. Acredita-se ainda que o gradiente de pressão resultante funcionaria no intuito de minimizar a contaminação endoneural por substâncias tóxicas externas ao feixe nervoso ³⁹. É provável também que o perineuro, juntamente com a BHN, desempenhe uma função essencial

na manutenção do meio osmótico e da pressão do fluido dentro do endoneuro³⁹. Deste modo, a BHN não seria tão somente uma barreira física, mas também apresentaria, de fato, uma interface ativa e competente. Apesar da BHN ser considerada relativamente mais permeável que a barreira hematoencefálica (BHE), demonstrou-se, entretanto, que a difusibilidade de algumas proteínas impermeáveis, como insulina, albumina, transferrina e imunoglobulina G, assim como fatores neurotróficos (fator de crescimento do nervo [NGF], fator neurotrófico-3 [NT3] e fator neurotrófico derivado do cérebro [BDNF]) foram semelhantes entre si⁴⁰.

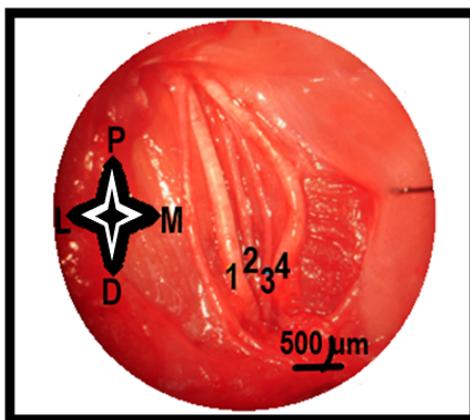
Estas inúmeras funções e relações entre as estruturas que compõem o nervo periférico tornam este órgão altamente dependente de um suprimento sanguíneo complexo³⁸. Sua irrigação é contemplada por uma intrincada rede vascular, constituída por anastomoses de plexos epineurais, perineurais e endoneurais, bem como uma vascularização segmentar derivada de várias artérias nutriciais (**Figuras 1A e 1B**). Desta maneira, o suprimento de sangue para o nervo é bastante delicado e pode, eventualmente, ser interrompido em decorrência de trauma³⁸, o que promove extensão do dano às estruturas nervosas após este evento.

1.2.1.2 - Considerações Específicas sobre o Nervo Mediano de Ratos

A anatomia dos nervos periféricos de ratos é muito similar àquela encontrada em seres humanos⁴¹⁻⁴². Como na espécie humana, há três nervos mistos terminais provenientes do plexo braquial e que alcançam o antebraço e mão: nervos (nn.) mediano, ulnar e radial⁴². O movimento de flexão dos dedos do rato é controlado pelos nn. mediano e ulnar, enquanto aqueles músculos (mm.) que promovem a extensão dos dedos apresentam inervação pelo n. radial⁴². No entanto, existe uma diferença entre roedores e humanos no que diz respeito à flexão da mão. Em humanos, os nn. mediano e ulnar contribuem para inervar os mm. extrínsecos e intrínsecos deste segmento. Já em ratos, os mm. flexores extrínsecos do dedo são proeminentemente inervados pelo n. mediano⁴³, enquanto o n. ulnar controla a maioria dos músculos intrínsecos (mm. lumbricais e interósseos), com a única exceção do m. flexor curto do polegar⁴². O n. mediano do rato apresenta em média $0,72 \pm 0,06$ mm de diâmetro e $22,67 \pm 1,63$ mm de comprimento (baseado em ratos da linhagem *Sprague Dawley*, com idade de $17,1 \pm 0,8$ semanas e massa de $467,3 \pm 21,8$ g)⁴⁴. Apresenta sua origem a partir de fibras dos troncos de C7, C8 e T1, quando então deixa a axila, na margem inferior do m. redondo maior, sendo acompanhado pela artéria (a.) braquial. No braço,

se localiza entre a cabeça longa do m. bíceps braquial e m. braquial, sendo acompanhado pelos vasos braquiais. Na parte média do braço, o n. mediano está localizado lateralmente aos vasos braquiais quando então cruza anteriormente estas estruturas, para mergulhar na fossa cubital do animal, medialmente aos vasos desta região (**Figura 2**). Em seguida, o n. mediano divide-se em ramo interósseo volar (que inerva os mm. flexores profundos dos dedos e pronador quadrado) e o ramo muscular (que inerva os mm. flexores superficial e profundo dos dedos assim como m. palmar longo) ⁴⁴.

Figura 2 - Relação das estruturas vásculo-nervosas na região cubital do rato



FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: P = proximal; D = distal; M = medial; L = lateral; 1 = n. mediano; 2 = a. braquial; 3 = v. braquial; 4 = n. ulnar.

NOTAS: membro torácico direito; visão do microscópio cirúrgico; magnificação de 25x.

1.2.2 – CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NO NERVO PERIFÉRICO

O passo inicial para se determinar a conduta adequada no caso de uma lesão traumática de nervo periférico (LTNP) é identificar a extensão do dano sofrido por esta estrutura nervosa ⁴⁵. Para este fim, existem dois modelos de classificação que se destacam:

O primeiro, descrito em 1943 por *Sir Herbert Seddon* ⁴⁶ (**Quadro 1**), é fundamentado na gravidade da lesão tecidual, no prognóstico e no tempo de recuperação ⁴⁷. Segundo a classificação de Seddon, há três tipos principais de lesão das fibras, com subsequente preservação ou perda de continuidade nervosa ⁴⁶: neuropraxia; axionotmese; neurotmese. A neurapraxia é o tipo mais leve de dano ao nervo, não

resultando em perda de continuidade nervosa e que apresenta recuperação funcional em todos os pacientes. Já na axoniotmese há uma perda relativa de continuidade das estruturas axonais e da mielina circundante, na qual permanecem intactas as estruturas perineural e epineural. Estas lesões são geralmente o resultado de uma injúria mais grave por esmagamento ou contusão. Por sua vez, a neurotmese é a forma mais grave de insulto ao nervo e que resulta em uma separação total dos cotos proximal e distal do nervo. Nesta situação, a perda funcional é completa e a intervenção cirúrgica torna-se justificada.

O segundo principal sistema de classificação de lesão nervosa foi aquele criado em 1951 por *Sir* Sidney Sunderland ⁴⁸ (**Quadro 1**). Este sistema se expande sobre os conceitos de Seddon, dividindo as lesões nervosas em cinco graus diferentes de gravidade. Nesta categorização, uma injúria de primeiro grau é idêntica à neuropraxia, enquanto um dano de segundo grau corresponde à axoniotmese. Insultos de terceiro grau ocorrem quando o endoneuro é interrompido, sendo sua recuperação altamente variável, com intervenção cirúrgica necessária em alguns pacientes. Já na lesão de quarto grau observa-se preservação somente do epineuro. Por sua vez, um dano de quinto grau é idêntico à neurotmese, ou seja, há a transecção completa do nervo. A intervenção cirúrgica e o tratamento são necessários para que seja possível qualquer recuperação das devastadoras lesões dos graus IV e V do nervo ⁴⁹. Embora o seu uso não tenha sido amplamente aceito, destaca-se ainda, a introdução de uma injúria de grau VI (**Quadro 1**) por McKinnon e Dellon no ano de 1988 ⁵⁰, que envolveria combinações de lesões Grau III-V ao longo de um nervo danificado ⁴¹.

Quadro 1 - Classificação de Seddon e Sunderland para Lesão de Nervo Periférico

Seddon	Sunderland	Descrição da Lesão
Neuropraxia	Grau I	Desmielinização focal segmentar (lesão da bainha de mielina)
Axoniotmese	Grau II	Axônio danificado com endoneuro, perineuro e epineuro intactos
	Grau III	Axônio e endoneuro lesionados com perineuro e epineuro preservados
	Grau IV	Axônio, endoneuro e perineuro danificados com epineuro intacto
Neurotmese	Grau V	Transecção completa do nervo
	Grau VI *	Níveis mistos de lesão ao longo do nervo

FONTE: o autor (2018), elaborado a partir de SEDDON, 1943 e SUNDERLAND, 1951.

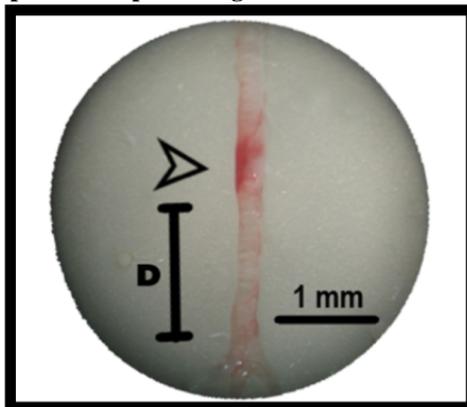
NOTA: * Lesão grau VI proposta por MCKINNON e DELLON, 1988.

Estes dois sistemas de classificação de lesão nervosa (Seddon e Sunderland) continuam a orientar o manejo de pacientes com insultos às

estruturas nervosas ⁵¹ ainda nos dias de hoje. Ademais, é importante salientar que pelo menos 70% das lesões graves deixam o nervo periférico em continuidade, mesmo quando os elementos do tecido conjuntivo dos nervos são interrompidos ⁴⁵.

Quando se aplica estes conceitos para seu emprego em estudos experimentais, classicamente evidenciam-se dois padrões de dano e regeneração nervosa. No primeiro modelo há uma completa transecção de todo o nervo, seguida pela reconstrução microcirúrgica da estrutura, o que caracterizaria uma injúria grau V de Sunderland ou neurotome ⁴². Já o segundo arquétipo é usualmente induzido mediante uma lesão por esmagamento (**Figura 3**). Este modelo mimetiza a correspondência clínica de uma lesão de Grau II de Sunderland, ou seja axoniotome ^{42;49}. Importante salientar que nos modelos de traumatismo de nervo periférico, a única diferença existente entre as espécies é que, ao contrário dos seres humanos, a lesão por esmagamento no rato não promove a formação de um neuroma clássico ⁴².

Figura 3 - Exemplo de axoniotome: aspecto do nervo mediano de rato imediatamente após a lesão por esmagamento



FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: seta = local da lesão; D = distância da lesão até ramificação distal do nervo.

NOTAS: visão de microscópio cirúrgico; magnificação 25x.

1.2.3 - FISIOPATOLOGIA DA LESÃO AO NERVO PERIFÉRICO

O SNP apresenta a característica de seus axônios possuírem a capacidade de regeneração. Entretanto, esta habilidade de formação de conexões funcionais é variável e, como visto, depende do grau de injúria sofrida. Além disso, o manejo das lesões nervosas traumáticas é

influenciado por múltiplos outros fatores, incluindo a idade do paciente; a localização do ferimento; a gradação do *deficit* na musculatura apendicular; o tempo decorrido após o insulto; e o dano ao tecido mole que o circunda^{38; 52}. Todos estes aspectos determinam a variabilidade do resultado funcional após o processo de reparo tecidual⁵², uma vez que os pacientes desenvolvem desde *deficit* sensoriais e motores leves àqueles devastadores e incapacitantes. Dentre os sintomas que podem se suceder à lesão se destacam parestesia; intolerância ao frio; disestesia; dor neuropática e graus diversos de perda de força no membro acometido³⁸. Deste modo, para a conduta adequada deste tipo de evento, torna-se imprescindível o conhecimento a respeito do processo de reparação que se segue após o fenômeno de dano tecidual.

Sendo assim, pode-se didaticamente dividir o processo de regeneração nervosa (período da lesão nervosa até recuperação estabelecida) em três fases gerais conhecidas como os "3Rs": regeneração de axônios; reinervação de órgãos-alvos; e recuperação de funções⁵³. Por conseguinte, subsequentemente à lesão do nervo periférico ocorre um processo de degeneração axonal conhecido como degeneração anterógrada ou *Walleriana*, em que há a desintegração granular do citoesqueleto axonal^{52;54}. Este evento ativo ajuda a criar um ambiente propício à reestruturação axonal, uma vez que a persistência de axônios distais prejudicaria a fase reparativa⁵².

Desta maneira, o processo regenerativo tem seu início com a resposta inicial à lesão. No neurônio, ocorre um arranjo de alterações morfológicas nos soma, axônio proximal e coto axonal distal. Para tanto, no corpo celular, há a dissolução dos corpos de *Nissl* e deslocamento periférico do núcleo. O perfil de transcrição do RNA mensageiro (RNAm) neuronal muda após a lesão para sustentar um programa de sobrevivência neuronal e consequente reorganização axonal⁵⁴. As proteínas associadas ao crescimento neuronal, tais como, GAP-43, tubulina, actina e fatores de crescimento e citocinas são reguladas positivamente^{51; 54}. Neste cenário, enquanto o nervo distal sofre degeneração *Walleriana*, o coto proximal inicialmente se retrai para o seu nodo de *Ranvier* e, em resposta aos fatores neurotróficos expressos, inicia-se o fenômeno do brotamento⁵⁴. Neste contexto, as células de *Schwann* (CSs) desempenham um papel importante na recuperação axonal⁵⁴. As CSs, até então estruturas quiescentes e altamente especializadas na transmissão nervosa, passam a se transdiferenciar de um fenótipo de condução para um pró-regenerativo, que é caracterizado por alterações na expressão do fator mitogênico e neurotrófico, bem como na atividade fagocitária⁵¹. Este dramático evento de

reprogramação destas células, com mudança do fenótipo, no qual as CSs se desdiferenciam e proliferam, permite que estas células atuem como mediadoras centrais e orquestradoras da resposta regenerativa axonal⁵⁶. Entre suas funções importantes, destacam-se: (i) limpeza do ambiente dos detritos axonais e miélnicos por meio de processos autofágicos; (ii) controle da quebra da barreira hematonervosa (BHN) e o subsequente influxo de células inflamatórias; e (iii) sustentação do crescimento axonal⁵⁵. Neste novo ambiente, as CSs quebram a mielina e fagocitam os restos axonais do coto distal dentro de 48 horas após a lesão³⁸. Paralelamente, acontece a perda da BHN, fazendo com que grandes moléculas cruzem o espaço endoneural, onde se encontram os axônios e as CSs⁵¹. Estas últimas expressam quimiocinas, que atraem células imunitárias⁵⁴. Assim, a entrada de células inflamatórias, particularmente macrófagos, se torna importante para a remodelação do nervo, uma vez que remove os restos de mielina e axônio residuais³⁸. De fato, o influxo de macrófagos provou ser um passo crítico na reparação nervosa já que, ao contrário do Sistema Nervoso Central (SNC), onde são recrutados os macrófagos M1 pro-inflamatórios, no SNP prepondera o fenótipo M2 anti-inflamatório, que desempenha o reparo tecidual no local da lesão⁵². Forma-se então uma ponte, que é constituída por matriz extracelular densa e células inflamatórias, em especial macrófagos, que são recrutados para esta área inicialmente não vascularizada. Desta forma, além de limpar os detritos inibitórios (restos axonais e de mielina), preparando o local para a regeneração, os macrófagos também são responsáveis pela regulação de constituintes da matriz extracelular (MEC)⁵². Simultaneamente, eles também expressam fatores de crescimento (notadamente VEGF-A) nesta área hipóxica, o que induz a vascularização. Estes vasos sanguíneos formados promovem a migração de CSs, mas fundamentalmente orientam o direcionamento destas células e dos axônios, conforme a polarização dos vasos que os acompanham, visto que as células de *Schwann* (CSs) não conseguem migrar diretamente através da matriz da ponte⁵⁵. Por sua vez, as CSs depositam laminina, fibronectina, tenascina, sulfato de heparina e colágeno para reforçar a MEC perdida por lesão⁵⁴. Além disso, expressam moléculas de adesão celular que são importantes na interação com proteínas da MEC e que modulam o crescimento axonal e a localização da trilha reparativa⁵⁴. Neste momento, os fibroblastos sinalizam uma mudança no comportamento das CSs, resultando na continuidade do processo regenerativo. As CSs então se alongam pela extensão de sua lâmina basal para constituir as bandas de *Büngner*, que fornecem o arcabouço para o novo crescimento axonal^{38,54-55}.

Deste modo, do ponto de vista fisiopatológico, os *deficit* funcionais decorrentes de lesões nervosas podem ser restabelecidos ou pelo menos compensados por três mecanismos neurais endógenos: (i) a reinervação de alvos desnervados pela regeneração de axônios lesionados; (ii) a reinervação por brotamento colateral de axônios não lesionados nas proximidades; e (iii) a remodelação de circuitos dentro do sistema nervoso central⁵³. Essencialmente no SNP, a reinervação do órgão-alvo ocorre por meio dos dois primeiros dispositivos⁴¹ sendo que, a taxa de recuperação neural em adultos é, em média, de aproximadamente 1 mm ao dia³⁸.

Nesse âmbito, quando as lesões acometem mais de 90% da população de axônios dentro de um nervo, a regeneração axonal é o principal meio de reparo. Para alcançar a recuperação completa, o nervo deve passar por três etapas principais: degeneração *Walleriana* (o processo de limpeza do coto distal), regeneração axonal e reinervação de órgãos-alvo. A falha de qualquer uma dessas fases pode contribuir para o mau resultado funcional⁴¹. Já naquelas lesões que atingem até 20% a 30% dos axônios, o brotamento colateral é o principal mecanismo de recuperação. Este fenômeno é iniciado nos primeiros quatro dias após a lesão e continua por aproximadamente três a seis meses, até que o retorno funcional ocorra. Como consequência, observa-se um aumento no tamanho da unidade motora remanescente, que é traduzido por hipertrofias musculares, na tentativa de compensar a desnervação inicial de outras regiões do músculo. Com o tempo, todavia, o músculo eventualmente se atrofia, à medida que as fibras sem inervação se encolhem e superam a capacidade das fibras musculares remanescentes em se expandirem. Neste caso há mais ramos axonais que brotam do que o número real de nervos que acabam inervando um órgão-alvo. Entretanto, aqueles ramos que não recebem fatores neurotróficos do órgão-alvo passam por um processo de poda e são fadados a se degenerarem⁴¹.

No caso específico da lesão nervosa por esmagamento existe uma estrutura de lâmina basal contínua que fornece orientação para a reorganização do nervo³⁸. Assim, após este tipo de injúria, a mielina paranodal perde o contato com o axônio e as incisões de *Schmidt-Lanterman* se dilatam à medida que a linha densa secundária adjacente se abre. Isso causa um colapso irreversível da periodicidade da mielina³⁹ de modo que, a integridade das barreiras físicas no sistema nervoso periférico também é afetada por este mecanismo de lesão. Consequentemente, ocorre um aumento na pressão do líquido endoneural, que é decorrente da alteração da permeabilidade da BHN.

Como não há sistema linfático no espaço endoneural, com a permeabilidade elevada e a pressão desequilibrada ocorre facilmente edema neste microambiente⁴⁰. Neste contexto destaca-se o VEGF-A, uma vez que esse fator de crescimento aumenta a permeabilidade vascular da BHN, com consequente infiltração de células inflamatórias⁵⁶.

1.2.4 - PAPEL DO VEGF NA REGENERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO

Recentemente várias pesquisas experimentais evidenciaram que o VEGF-A desempenharia papéis não apenas na angiogênese, mas também apresentaria efeitos diretos nas neurogênese, neuroproteção e neuroregeneração⁵⁷⁻⁵⁹. Especialmente no SNP, há a descrição de experiências *in vitro* usando cultura de gânglio da raiz dorsal (DRG) em que o VEGF promoveu o crescimento de neuritos, aumentou a sobrevivência celular, favoreceu a proliferação de células de *Schwann*, além de ter prevenido o colapso do cone de crescimento axonal⁵⁷. Outro estudo experimental evidenciou que o VEGF-A apresenta potente fator neuroregenerativo, tendo promovido o alongamento dos neuritos e que o VEGF-B também proporcionaria a ramificação destes processos neuronais⁵⁸.

Já em estudo com terapia genética, porém usando modelo de lesão por neurotome em nervo isquiático, evidenciou-se uma melhora da contagem axonal e de padrões eletrofisiológicos com a utilização de plasmídeo de VEGF. O mesmo trabalho revelou incremento nas respostas regenerativas com o uso sinérgico em ambiente rico em ácido hialurônico⁵⁹. Destaca-se ainda a descrição de a sinalização VEGF-A / VEGFR2 ser essencial para a sobrevivência de neurônios motores inferiores (NMI) na medula espinal sob condições fisiológicas⁶⁰. Esta via também promoveria a sobrevivência dos NMI sob condições patológicas⁶⁰⁻⁶². A importância deste fator de crescimento na regeneração nervosa ainda é constatada por o VEGF ser capaz de sustentar o fenótipo colinérgico em motoneurônios extraoculares danificados em ratos⁶³. Além disso, demonstrou-se que sua inibição agravaria as neuropatias sensoriais dolorosas induzidas pelo paclitaxel⁶⁴.

Deste modo, o VEGF desempenha uma atribuição de relevante notoriedade no processo de regeneração nervosa, em decorrência da simbiose entre os sistemas vascular e nervoso.

Assim, diante do exposto, uma vez que ocorre uma maior predisposição a lesões de nervo por quedas na população oncológica e sabendo que uma parcela destes pacientes está em uso de drogas antiVEGF que, em tese, diminuiria a neuroregeneração, a pergunta que se faz é se poderia haver prejuízo na regeneração dessas lesões nervosas traumáticas em pacientes que necessitem utilizar esta classe de medicamento. Para tanto, empregou-se o modelo experimental em ratos para testar a hipótese de se o bevacizumab implicaria em piora nos parâmetros funcionais, morfológicos e bioquímicos de lesão de nervo periférico tipo esmagamento.

2. OBJETIVOS

2.1 - GERAL

Avaliar o efeito do anticorpo monoclonal IgG1 humanizado recombinante de VEGF-A (bevacizumab) nos parâmetros funcionais, morfológicos e bioquímicos dos mecanismos de neuroregeneração, utilizando-se como modelo experimental a lesão por esmagamento de nervo mediano em ratos da linhagem *Wistar*.

2.2 - ESPECÍFICOS

- (1) Determinar o efeito do anti-VEGF-A sobre o retorno da atividade de preensão do membro torácico que sofreu dano no nervo mediano, por meio de mensuração da força;
- (2) Avaliar a ação do inibidor de VEGF-A sobre valores dos diâmetros do nervo e da fibra axonal na área da injúria tecidual;
- (3) Investigar a modulação do anticorpo do VEGF-A sobre a expressão da concentração de VEGF no local da lesão por esmagamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

* Declaração de ética

Esta pesquisa do tipo experimental teve projeto aprovado junto à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o protocolo PP0910 (**Anexo 1**). A entidade segue as diretrizes nacionais e internacionais preconizadas para a utilização de modelos animais para experimentação.

* Animais: Características, Condições Veterinárias e Acondicionamento

Realizaram-se os ensaios em ratos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar*, adultos, do sexo masculino, com peso médio de 250-300 gramas e idade entre 12 e 14 semanas. Estes animais eram provenientes do Biotério Central da UFSC e apresentavam acompanhamento veterinário, o que assegura estado sanitário adequado para realização dos experimentos.

Acondicionaram-se os roedores em caixas padrão de polipropileno (49x34x26 cm), que comportavam 4 animais por unidade, para manter a socialização destes e conseqüentemente diminuir o estresse pré e pós-cirurgia. O ambiente apresentava seu piso coberto por uma camada de maravalha (raspa de madeira picada), que era trocada duas vezes durante a semana. No espaço físico de condicionamento dos ratos garantiu-se controle de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), acesso *ad libitum* à alimentação (ração para animais de laboratório Biotec[®], da indústria Biobase Alimentação Animal [Águas Frias, SC, Brasil]) - e à água filtrada, com presença de ciclo claro-escuro de 12h. Procedeu-se avaliação de bem-estar dos roedores periodicamente durante todas as fases do experimento. As etapas dos ensaios ocorreram nos laboratórios de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) e Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE), respectivamente, pertencentes aos Departamentos de Ciências Fisiológicas (CFS), do Centro de Ciências Biológicas (CCB) e Clínica Cirúrgica (CLC), do Centro de Ciências da Saúde (CCS), situados na UFSC.

* Planejamento estatístico e Definição do tamanho da amostra

Seguindo o princípio dos 3 Rs, fundamentado por dados da literatura ⁶⁵⁻⁶⁷ e após cálculos estatísticos, estabeleceu-se o número de animais em cada grupo experimental como sendo de seis para comportamento e histologia e de quatro para bioquímica, o que totalizou cento e trinta e dois ratos. Os roedores foram atribuídos a um ou outro grupo de forma randomizada.

O cálculo estatístico, que visou definir o tamanho da amostra e garantir robustez aos resultados ⁶⁸, baseou-se no teste de estimativas, por meio da fórmula descrita abaixo (**Equação 1**):

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta) \times \sigma^2 \times 2}{\Sigma} \quad (1)$$

onde:

- $Z\alpha$ (fixado em 0,05): baseado na tabela de valores de z para distribuição bi-caudal
- $Z\beta$ (fixado em 0,10): baseado na tabela de valores z para distribuição unicaudal
- σ^2 (variabilidade populacional): valor do desvio padrão da média populacional
- Σ (diferença entre as médias de cada grupo): valor da diferença média entre os grupos experimentais

* Obs = Uma vez que se tem dados não pareados (simultâneos, com grupo controle e experimental), a expressão deve ser multiplicada por 2.

Com isso, sustentados por dados obtidos de estudos prévios no próprio laboratório LANDI esperou-se uma variabilidade populacional em torno de 30% e uma diferença entre os grupos experimentais de 40% para o principal parâmetro experimental (comportamental). Ao se utilizar de teste T não pareado na comparação entre os grupos e valores de alfa (erro tipo I) e beta (erro tipo II) de 5% e 90% (grau de confiança 95% e poder do teste de 90%), teve-se, assim, um $Z\alpha$ de 1,96 e $Z\beta$ de 1,28, respectivamente, o que resultou em um número de cinco animais por grupo experimental como é demonstrado na equação abaixo:

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta) \times \sigma^2 \times 2}{\Sigma} = \frac{(1,96 + 1,28) \times 30 \times 2}{40} = \frac{3,24 \times 30 \times 2}{40} = 4,86 \cong 5 \text{ animais}$$

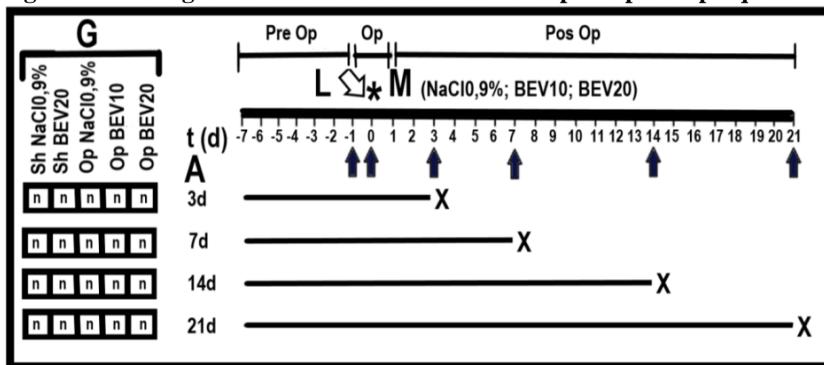
Deve-se ainda considerar possíveis perdas ou fatores confusionais durante os procedimentos. Estes foram estimados em 15%, sendo, portanto, necessária a inclusão de mais 1 animal por grupo ($4,86 \times 0,15 = 0,729 \cong 1$), o que totalizou **6** animais em cada grupo experimental para garantir que as conclusões dos experimentos fossem válidas, considerando as variações na resposta comportamental dos animais e

dos diferentes procedimentos adotados em cada experimento. No final utilizou-se 132 (cento e trinta e dois) ratos, uma vez que adicionalmente empregou-se mais 12 (doze) animais para avaliação bioquímica de um dia chave para a farmacocinética do medicamento estudado. Assim, o número de animais estabelecido em cada grupo experimental estava em concordância ao sugerido pela literatura. O quantitativo individual de cada experimento encontra-se na descrição do texto.

* Delineamento Experimental

Dividiu-se a amostra em 5 grupos de animais, denominados: (i) *sham* (controle falso operado) com solução de salina isotônica (*Sh* NaCl 0,9%); (ii) *sham* com solução de droga bevacizumab a 20 mg/kg (*Sh* BEV20); (iii) cirurgia para esmagamento do nervo com solução salina isotônica (*Op* NaCl 0,9%); (iv) cirurgia para esmagamento do nervo com solução de bevacizumab a 10 mg/kg (*Op* BEV10); e (v) cirurgia para esmagamento do nervo com solução de bevacizumab a 20 mg/kg (*Op* BEV20). Distribuiu-se cada grupo, de forma aleatória, em 4 períodos (3 dias; 7 dias; 14 dias; 21 dias), de modo a conhecer-se a resposta dos animais ao longo do tempo (**Figura 4**).

Figura 4 - Fluxograma ilustrativo do delineamento principal da pesquisa



FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: Sh NaCl 0,9% = grupo *sham* com solução salina isotônica; Sh BEV20 = grupo *sham* com solução bevacizumab 20 mg/kg; Op NaCl 0,9% = grupo operado com solução salina isotônica; Op BEV 10 = grupo operado com solução bevacizumab 10 mg/kg; Op BEV 20 = grupo operado com solução bevacizumab 20 mg/kg; G = grupos; L = lesão; M = medicamento; A = avaliação em períodos chaves do experimento; seta vazada = indução da lesão; asterisco = infusão de solução salina ou BEV 10-20 mg/kg; seta cheia = momento da avaliação; x = dia da eutanásia; casinhas "n" = representativas da quantidade de animais em cada grupo; t = tempo; d = unidade de medida de tempo "dia".

Para o estudo funcional, avaliou-se os animais nos 4 intervalos de tempo preconizados (**Tabela 1**). Já para o estudo morfológico decidiu-se comparar a fase de resposta inflamatória aguda (3 dias) com resposta inflamatória tardia (21 dias), em que a droga nos ratos já teria sua ação concluída⁶⁹⁻⁷⁰. Maiores detalhes da avaliação histológica são descritos no item que discorre sobre o assunto.

Tabela 1 - Distribuição dos animais para avaliação comportamental e histológica

GRUPOS/PERÍODOS	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	TOTAL
Sh NaCl 0,9%	6	6	6	6	24
Sh BEV 20	6	6	6	6	24
Op NaCl 0,9%	6	6	6	6	24
Op BEV 10	6	6	6	6	24
OP BEV 20	6	6	6	6	24
TOTAL	30	30	30	30	120

FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: Sh NaCl 0,9% = grupo *sham* com solução salina isotônica; Sh BEV20 = grupo *sham* com solução bevacizumab 20 mg/kg; Op NaCl 0,9% = grupo operado com solução salina isotônica; Op BEV 10 = grupo operado com solução bevacizumab 10 mg/kg; Op BEV 20 = grupo operado com solução bevacizumab 20 mg/kg.

Em seguida, analisou-se a expressão temporal da concentração de VEGF entre os grupamentos de animais em uso ou não de anticorpo anti-VEGF-A. Para tanto, empregou-se nesta etapa os seguintes grupos: *sham* com solução de salina isotônica (*Sh NaCl 0,9%*); cirurgia para esmagamento do nervo com solução de salina isotônica (*Op NaCl 0,9%*); cirurgia para esmagamento do nervo com solução de droga bevacizumab a 10 mg/kg (*Op BEV10*). Cada grupo, contendo 4 animais, foi distribuído temporalmente de forma aleatória nos 4 períodos chave para a farmacocinética da droga: 1 dia; 7 dias; 14 dias; 21 dias (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Distribuição dos animais para avaliação bioquímica

GRUPOS/PERÍODOS	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	TOTAL
Sh NaCl 0,9%	4	4	4	4	12
Op NaCl 0,9%	4	4	4	4	12
Op BEV 10	4	4	4	4	12
TOTAL	12	12	12	12	48

FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: Sh NaCl 0,9% = grupo *sham* com solução salina isotônica; Sh BEV20 = grupo *sham* com solução bevacizumab 20 mg/kg; Op NaCl 0,9% = grupo operado com solução salina isotônica; Op BEV 10 = grupo operado com solução bevacizumab 10 mg/kg; Op BEV 20 = grupo operado com solução bevacizumab 20 mg/kg.

Obteve-se as amostras do anticorpo monoclonal IgG1 humanizado recombinante que se liga ao fator de crescimento endotelial vascular humano A, Bevacizumab (*Avastin*[®]), da indústria farmacêutica F. Hoffmann-La Roche Ltd. (*Basileia, BS, Suíça*) por doação, em parceria com o Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON), pertencente à Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Estado de Santa Catarina (SES/SC), Brasil. Baseado em trabalhos prévios de outros autores^{66, 69}, o tempo de esmagamento foi estabelecido em 30 (trinta) segundos para todas as etapas do ensaio. Os experimentos e posteriores avaliações ocorreram sempre no período matutino (horário de 09 às 12h) e mensurou-se a massa dos animais imediatamente antes de cada procedimento cirúrgico, que sempre foi realizada pela mesma equipe. Na unidade experimental (LANDI ou TOCE), os roedores passaram por período de adaptação pré-procedimento de 1 semana (**Figura 4**). No intuito de minimizar os efeitos de enviesamento subjetivo no processo de escolha de animais (para o grupo de estudo ou o seu controle) efetuou-se um processo de randomização e, para não influenciarem no resultado, os pesquisadores que procediam as observação e coleta dos resultados da avaliação comportamental, análise histopatológica e bioquímica se encontravam cegados nestas fases.

*** Procedimento Experimental e suas Etapas**

Anestesiou-se os animais por meio de injeção intramuscular (IM) administrada na face interna do membro pélvico direito, com solução composta por cloridrato de cetamina 50% (50g/100ml) e cloridrato de xilazina 2% (2g/100ml), na proporção 1:1, na dose de 0,3 ml/100g de massa corporal dos ratos. As doses usadas foram baseadas em protocolos sugeridos pela CEUA-UFSC. O animal foi considerado anestesiado quando não exibia reação motora à preensão do coxim adiposo de qualquer um dos membros.

Após o procedimento anestésico colocou-se os ratos em decúbito dorsal sobre um suporte de madeira plana de 30 x 35 cm, sendo imobilizados por meio da fixação de esparadrapo em cada um dos membros torácicos e pélvicos. Posteriormente, seguiu-se a aplicação intraperitoneal (IP) de bevacizumab (10 mg/kg ou 20 mg/kg) ou solução de NaCl 0,9% (1 ml) pré-trauma (procedimento).

Efetuiu-se então a cirurgia no membro torácico direito dos roedores. Inicialmente tricotomizou-se a face ventral da extremidade proximal deste segmento do animal a ser submetido ao procedimento selecionado.

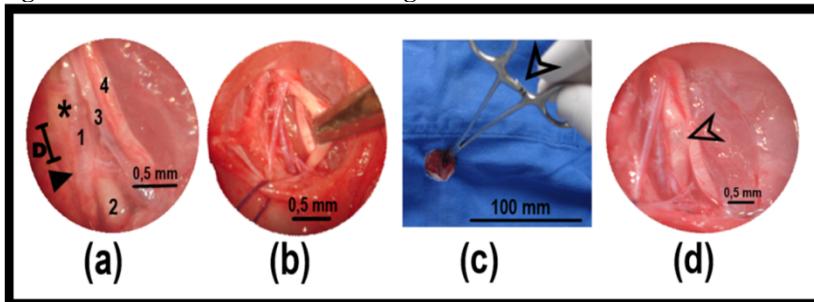
Seguiu-se então com a realização de antissepsia com iodopovidona (PVPI) nesta área glabra criada. Todas as fases subsequentes do procedimento operatório desenvolveram-se também de forma antisséptica e foram executadas pelo mesmo cirurgião.

Após conclusão da anestesia, injeção do fármaco e preparo do animal, realizou-se o procedimento que envolveu as seguintes etapas: incisão de aproximadamente 25 mm abrangendo a face medial ventral do membro torácico direito, seguida por diérese delicada em planos anatômicos. Com auxílio do microscópio cirúrgico MC-M1232[®], da empresa DF Vasconcelos S.A. (*Valença, RJ, Brasil*), sob magnificação de 25 x, visualizou-se e dissecou-se os nn. mediano e ulnar e a a. braquial até sua divisão em aa. ulnar e radial, na fossa cubital do animal (**Figura 5A**). Nos grupos de animais denominados operados, promoveu-se então a axoniotmese, por meio de lesão por esmagamento do n. mediano, 1 cm proximalmente à bifurcação da a. braquial (**Figura 5B**).

Para esta etapa, utilizou-se porta-agulhas de *Mayo-Hegar* com ponta de tungstênio (vída), 14 cm, 5 ½”, da fábrica Edlo[®] / ITM S.A. Indústria de Tecnologias Médicas (*Canoas, RS, Brasil*) durante um intervalo de tempo de 30 segundos. Estabeleceu-se o travamento na 1ª cremalheira (**Figura 5C**) e observou-se uma área de contato de aproximadamente 1 cm², o que determinou uma pressão de 24,2 N/cm² (2,42 x 10⁵ N/m² ou 2,42 x 10⁵ Pa), que provocou a lesão no animal (**Figura 5D**). Este valor de prensão do instrumental foi testado previamente no Laboratório de Ensaio Mecânicos Armin Sonnenhohl, do Grupo de Análise e Projeto Mecânico (GRANTE), vinculado ao Departamento de Engenharia Mecânica (EMC), Centro de Ciências Tecnológicas (CTC) da Universidade Federal de Santa Catarina (para maiores detalhes da calibração ver descrição em **Apêndice**). Nos grupos de animais *sham* esta etapa não foi executada.

Seguiu-se então, a realização de revisão de hemostasia e a síntese da pele com pontos simples, utilizando-se fio de poliglactina 910, trançado, 3.0, agulha cortante curva, Vicryl[®], da marca Ethicon / Johnson & Johnson do Brasil Ltda. (*São Paulo, SP, Brasil*).

Figura 5 - Procedimento na região da fossa cubital do animal



FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: (a) Identificação do local da lesão (D = distância da lesão à bifurcação da artéria braquial; asterisco = local da lesão; seta = bifurcação da a. braquial; 1 = a. braquial; 2 = n. mediano; 3 = v. braquial; 4 = n. ulnar); (b) Esmagamento no nervo mediano; (c) Modelo de lesão do nervo apresentando porta-agulhas, com seta indicativa destacando o travamento na 1ª cremalheira; (d) Aspecto do nervo após esmagamento imediato com seta indicativa do local da lesão.

NOTAS: a,b,d = visão do microscópio cirúrgico, magnificação 25x; c = visão macroscópica.

Após o procedimento cirúrgico, recondicionou-se os animais em suas caixas de plástico. Uma vez atingido o período de avaliação preconizado para cada grupo, submeteu-se os roedores à eutanásia (realizada em câmara de gás, utilizando-se dióxido de carbono - CO₂), de forma a evitar qualquer sofrimento aos animais, seguindo as normativas estabelecidas pela CEUA-UFSC. Após esta etapa, que foi realizada compartilhadamente nos laboratórios LANDI e TOCE, seguiu-se então a avaliação histológica e bioquímica do VEGF.

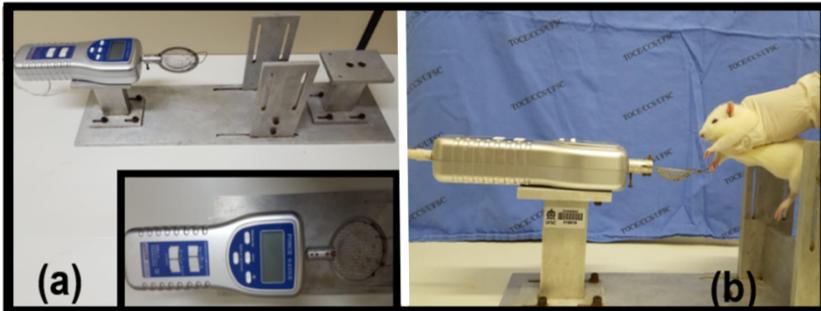
* Teste para Mensuração da Resposta Funcional

Para a avaliação comportamental do retorno da atividade flexo-pronadora do membro torácico que sofreu injúria no nervo mediano, utilizou-se o teste de preensão.

Ao contrário de Bertelli e Mira⁴³, pioneiros do teste, que realizavam a avaliação segurando delicadamente a cauda do animal e exerciam uma força vertical perpendicular à superfície da bancada e em direção oposta ao dinamômetro, neste modelo realizou-se o teste carregando gentilmente o corpo do animal, mantendo-o em posição natural com abdome voltado paralelamente ao chão, permitindo que as suas extremidades e a cauda estivessem livres. Seguiu-se de aproximação do roedor ao dinamômetro digital, modelo *DD 500*[®], da indústria Instrutherm Instrumentos de Medição Ltda (*São Paulo, SP, Brasil*)

(**Figura 6A**). Neste momento, o rato instintivamente agarrava a barra do aparelho e então o pesquisador exercia uma força paralela à superfície da bancada, em direção oposta ao instrumento, de modo a desfazer a preensão do animal à barra (**Figura 6B**). A barra, sob a forma de um círculo, estava conectada a um transdutor do tipo força-deslocamento, que automaticamente transferia o valor dessa força (expressa em grama-força) a um amplificador de pico e que mostrava o valor em sua tela. A força máxima era atingida quando o animal perdia o contato de sua pata com a barra circular. Testou-se cada animal cinco vezes e o valor da média foi então registrado. As avaliações de força ocorreram nos dias 3, 7, 14 e 21 após a lesão nervosa. Salienta-se ainda que todos os animais tiveram a força do membro torácico mensurada previamente em momento pré-procedimento, chamado período basal.

Figura 6 - Teste de resposta funcional



FONTE: o autor (2018).

NOTAS: (a) Aparelho utilizado para análise da força de preensão - disposição na bancada e detalhe do aparelho; (b) Detalhe do teste de preensão.

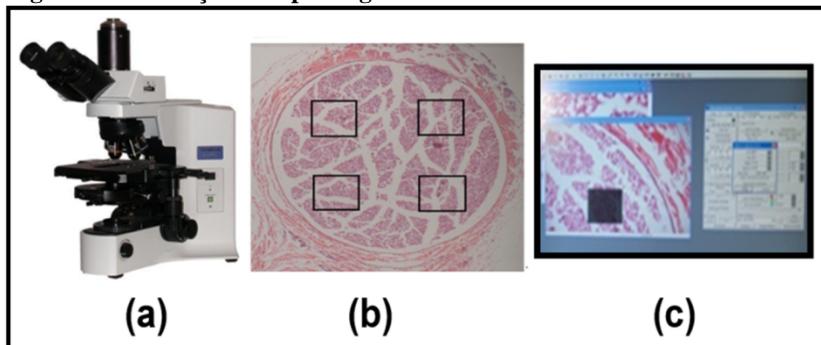
* **Análise Histopatológica**

Uma vez concluído o período determinado de avaliações para cada grupo, procedeu-se a coleta do material (nervo mediano). Assim, no protocolo preconizado, realizou-se a fixação em solução de formaldeído 10% durante 24h. Seguiu-se então 3 seqüências de lavagem e iniciou-se a inclusão com a desidratação crescente em álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%). Posteriormente efetuou-se a diafanização em xilol e impregnação em parafina com a confecção dos blocos. Procedeu-se então o seccionamento destes em cortes de 5 µm, utilizando micrótomo rotativo, *RM 2125RT*[®], da marca Leica Biosystems Nussloch GmbH (*Nußloch, BW, Alemanha*) seguida de montagem das lâminas. Finalizou-se com a coloração em hematoxilina-eosina (HE) e posterior análise das

lâminas em microscópio de luz (ML). Realizou-se as etapas de processamento das lâminas nos laboratórios de Histologia, do Departamento de Ciências Morfológicas (MOR), CCB, UFSC e de Patologia, do Departamento de Patologia (PTL), CCS, UFSC.

Posteriormente procedeu-se a captura de imagens no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), pertencente ao CCB, UFSC. Nesta etapa utilizou-se um Microscópio *Olympus BX41*®, da marca Olympus Corporation (*Shinjuku, Tóquio, Japão*) (**Figura 7A**). O Sistema de Captura de Imagens consistia de uma câmera digital colorida de 3.3 Mpx (megapixels) e do programa de captura de imagens *Q-capture Pro 5.1*®, Q-imaging (*Surrey, BC, Canadá*). Para tanto, em um aumento de 400x dividiu-se a área do nervo em quadrantes (**Figura 7B**). Em cada quarta parte do círculo delimitou-se uma área de $500\ \mu\text{m}^2$ (**Figura 7C**). Nestas regiões especificadas escolheu-se aleatoriamente 20 fibras nervosas, o que totalizou 80 fibras por nervo.

Figura 7 - Avaliação histopatológica



FONTE: o autor (2018).

NOTAS: (a) Imagem ilustrativa do microscópio utilizado para captura de imagem; (b) Representação das áreas de $500\ \mu\text{m}^2$ em cada quadrante do nervo; (c) Área de $500\ \mu\text{m}^2$ visualizada com o programa de captura utilizado.

Subseqüentemente realizou-se a análise das lâminas em aumentos de 100 e 400x. As características quantitativas mensuradas foram: diâmetro do nervo (D); diâmetro das fibras no nervos (d); razão diâmetro nervo/diâmetro da fibra (D/n). Simultaneamente, realizou-se uma avaliação qualitativa, que verificou aspectos como: alterações na arquitetura do nervo como descontinuidade de perineuro ou presença de fibrose no nervo e modificações na organização fascicular; presença de células inflamatórias; perda de axônios mielínicos grandes.

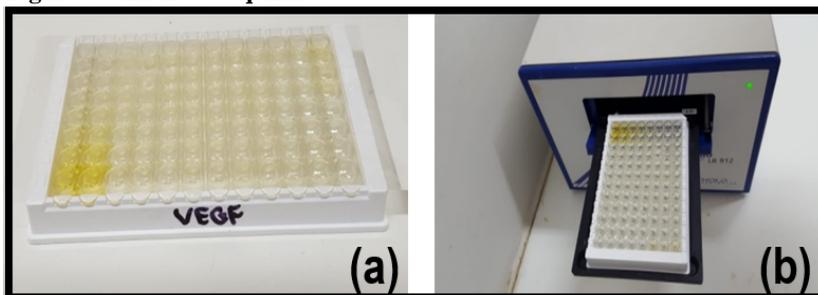
Esta etapa foi desempenhada por patologista, que estava cegado em relação ao delineamento do estudo, sendo a histomorfometria e análise quantitativa realizada de forma manual com auxílio do programa *Image J*, disponibilizado pelo *National Institutes of Health (Bethesda, MD, EUA)*.

* Avaliação da Expressão do VEGF

Após a conclusão do tempo preconizado de exames para cada grupo, procedeu-se também a retirada das peças de nervo mediano para análise bioquímica da expressão do VEGF. Assim, armazenou-se os fragmentos nervosos em *ependorfs* que foram mantidos em $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização do teste de ELISA.

Chegado o momento da avaliação, o material foi então descongelado e homogeneizado. No ensaio do marcador bioquímico inferiu-se então a concentração de VEGF (unidade em pg/ml) no local da lesão do nervo. Para isso utilizou-se *Kit* de ELISA sanduíche para VEGF-A específico para rato *Ab100787*[®], Abcam (*Cambridge, MA, EUA*), que apresentava limiar de detecção de 2 pg/ml . A placa (**Figura 8A**) foi analisada no aparelho de leitura de ELISA *Apollo 8*[®], da empresa Berthold Technologies GmbH & Co.KG (*Bad Wildbad, BW, Alemanha*) (**Figura 8B**). Procedeu-se esta etapa no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), CFS, CCB, UFSC.

Figura 8 - Análise bioquímica



FONTE: o autor 2018).

NOTAS: (a) Placa de ELISA semeada; (b) Aparelho para leitura do resultado.

* Métodos Estatísticos

Para a análise estatística dos resultados utilizou-se o programa *Prism 6.07*[®], da empresa GraphPad Software (*La Jolla, CA, EUA*). A normalidade dos dados foi avaliada por teste de *Shapiro Wilk*.

Nos parâmetros comportamentais (funcionais) usou-se ANOVA de 2 vias com Medidas Repetidas e teste *post hoc* de comparação de Dunnet. Já para a inferência dos dados intragrupos realizou-se ANOVA de 2 vias Ordinária com teste *post hoc* de comparação de Tukey. Interpretou-se os dados morfométricos por ANOVA 1 via com análise *post hoc* de Tukey. Por sua vez analisou-se os dados bioquímicos por ANOVA 1 via e teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnet.

As unidades de medida empregadas em cada avaliação foram: força, medida em grama-força (g.f); imagens histológicas obtidas em magnificação de 100 e 400x se apresentaram em micrômetro (μm); dimensões do nervo e fibras nervosas foram mensuradas respectivamente em milímetro (mm) e micrômetro (μm); já a concentração do VEGF foi expressa em picograma por mililitro (pg/ml). Estabeleceu-se o nível de significância como sendo: $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****). Os valores foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) na avaliação funcional e bioquímica e média \pm desvio padrão (DP) na análise histológica.

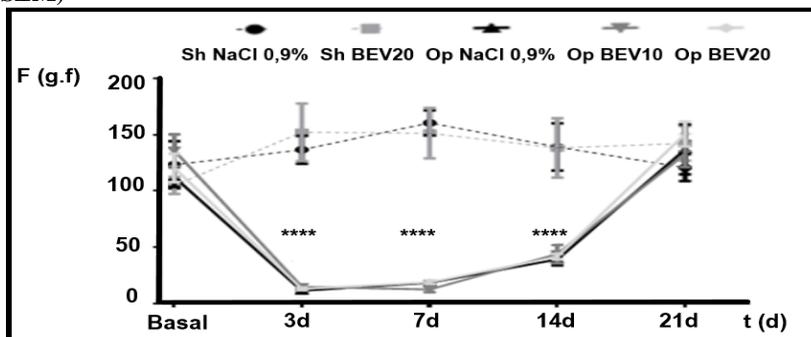
4. RESULTADOS

4.1 - FUNCIONAL (TESTE DE PREENSÃO)

Durante um período de 21 dias realizou-se a comparação intergrupos dos valores de força: *sham* com solução de salina isotônica (*Sh NaCl 0,9%*); *sham* com solução de droga bevacizumab a 20 mg/kg (*Sh BEV20*); cirurgia para esmagamento do nervo com solução de salina isotônica (*Op NaCl 0,9%*); cirurgia para esmagamento do nervo com solução de droga bevacizumab a 10 mg/kg (*Op BEV10*); cirurgia para esmagamento do nervo com solução de droga bevacizumab a 20 mg/kg (*Op BEV20*).

Para tanto, procedeu-se ANOVA de 2 vias com Medidas Repetidas e análise *post hoc* por meio do teste de *Tukey*. A interação [F (DFn, DFd)] encontrada foi $F(16, 100) = 12,18$ ($p < 0,0001$), sendo que se expressou os dados pela Média e Erro Padrão das Médias (SEM). A **Figura 9** representa a relação evolutiva da força ao longo do tempo entre os grupos.

Figura 9 - Avaliação temporal da força intergrupos no teste de preensão (relação grupos *Sham* com grupos Operados (valores expressos em Média ± SEM)



FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: F = força; t = tempo; g.f. = unidade de medida de força “grama-força”; d = unidade de medida de tempo “dia”; Sh NaCl 0,9% = grupo *sham* com solução salina isotônica; Sh BEV20 = grupo *sham* com solução bevacizumab 20 mg/kg; Op NaCl 0,9% = grupo operado com solução salina isotônica; Op BEV 10 = grupo operado com solução bevacizumab 10 mg/kg; Op BEV 20 = grupo operado com solução bevacizumab 20 mg/kg; **** $p < 0,0001$; SEM = Erro Padrão das Médias.

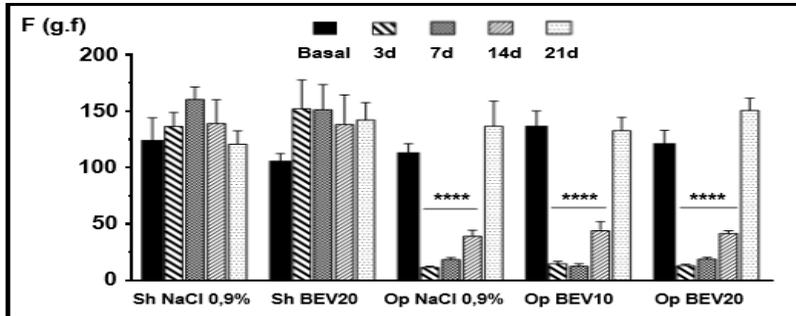
Observa-se que não houve diferença entre os subgrupos no período basal, assegurando-se a homogeneidade da amostra. Descobriu-se ainda

que não ocorreu diferença entre os grupos *shams* (NaCl 0,9% e BEV20) durante todo o período avaliado. Ao se avaliar os períodos 3, 7 e 14 dias, evidenciou-se diferença com forte significância nos achados ($p < 0,0001$) dos 3 grupos operados em relação ao *Sh* NaCl 0,9% ou *Sh* BEV20. O fenômeno deixou de existir no 21º dia, onde todos já não apresentavam diferença significativa com os grupos *sham*, em resposta à recuperação de força em todos os grupos operados. Destaca-se ainda que durante todo o período não se observou diferença estatística ao se comparar os subgrupos operados entre si.

Em seguida, realizou-se a comparação pormenorizada de cada grupo (intragrupos) ao longo do tempo: *Sh* NaCl 0,9%; *Sh* BEV20; Op NaCl 0,9%; Op BEV10; Op BEV20, durante o período de 21 dias, sempre se comparando com o período basal de cada grupo.

Para este fim, utilizou-se ANOVA 2 vias com Medidas Repetidas e análise *post hoc* por meio de teste de comparação múltipla de Dunnett. A interação [F (DFn, DFd)] encontrada foi $F(16, 100) = 12,18$ ($p < 0,0001$). Expressiu-se os dados pela Média e Erro Padrão das Médias (SEM). A **Figura 10** representa a relação evolutiva da força ao longo do tempo em cada grupo.

Figura 10 - Avaliação temporal da força intragrupos no teste de prensão (relação do valor basal de cada grupo com os resultados obtidos a cada dia de evolução nos respectivos grupos (valores expressos em Média \pm SEM))



FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: F = força; g.f = unidade de medida de força “grama-força”; d = unidade de medida de tempo “dia”; Sh NaCl 0,9% = grupo *sham* com solução salina isotônica; Sh BEV20 = grupo *sham* com solução bevacizumab 20 mg/kg; Op NaCl 0,9% = grupo operado com solução salina isotônica; Op BEV 10 = grupo operado com solução bevacizumab 10 mg/kg; Op BEV 20 = grupo operado com solução bevacizumab 20 mg/kg; **** $p < 0,0001$; SEM = Erro Padrão das Médias.

Demonstrou-se que não houve diferença nos grupos *sham* (NaCl 0,9% e BEV20) ao longo do tempo. Entretanto, em todos os grupos operados

(com ou sem aplicação da droga), aconteceu uma inflexão nos valores da força, que decaem até o 14º dia de maneira expressiva e significativa estatisticamente, quando comparados aos seus respectivos valores basais. Este fenômeno deixou de existir na semana subsequente, aos 21 dias da avaliação, com retorno a valores dos padrões originais. Neste período, em todos os grupos operados, os resultados obtidos não apresentaram significância quando confrontados com os seus valores basais concernentes.

4.2 – MORFOLÓGICOS (ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICA E QUALITATIVA)

A avaliação dos padrões morfológicos seguiu-se em 2 momentos da regeneração, nos 3º e 21º dias e envolveu 2 análises: quantitativa e qualitativa.

Para a avaliação histomorfométrica intergrupos utilizou-se ANOVA de 1 via com Medidas Repetidas e ulterior análise *post hoc* por meio do teste de *Tukey*.

Inicialmente estudou-se o diâmetro do nervo mediano nos grupos distintos. A interação [F (DFn, DFd)] encontrada foi F (9, 17) = 0,7470 (p = 0,6635). Expressou-se os dados pela Média e Desvio Padrão (DP). Pode-se observar que todos os grupos pós-trauma apresentaram aumento das dimensões de sua espessura quando comparados aos grupos controles (*sham*) nos 2 intervalos de tempos avaliados (3 e 21 dias). No período de 3 dias, aqueles animais cuja inibição do VEGF foi maior após o trauma (Op BEV20) demonstraram uma tendência de desenvolver maior diâmetro em relação aos demais grupos neste período específico (**Tabela 3**). Interessante ressaltar ainda que, na terceira semana (21 dias), este padrão morfológico ao qual há um diâmetro maior dos grupos submetidos ao esmagamento em relação ao *sham* também se manteve. Entretanto, deve-se salientar que todos estes resultados em que ocorreu diferenças entre as médias dos grupos (nos 2 períodos descritos) não se revelaram significantes estatisticamente.

Do mesmo modo, a inferência do diâmetro das fibras nos diversos grupos também demonstrou que as diferenças entre suas médias (nos 2 intervalos de tempo descritos) não foram significantes estatisticamente. A interação [F (DFn, DFd)] encontrada foi F (9, 21) = 1,515 (p = 0,2067), com dados expressos pela Média e Desvio Padrão (DP). Outro achado importante foi de que no 21º dia os valores dos diâmetros dos grupos operados obtiveram resultados próximos entre si, porém curiosamente de espessura menores quando confrontados aos grupos

sham (Tabela 3). Já a razão D/d não apresentou relação entre os diferentes grupos ou mesmo significância estatística no mesmo dia ou entre os diferentes dias.

Tabela 3 - Parâmetros histomorfométricos intergrupos nos 3° e 21° dias (valores expressos em Média ± DP, quando indicados)

GRUPOS /DIAS		3 DIAS (média ± DP)	21 DIAS (média ± DP)
Sh NaCl 0,9%	D	0,1884 ± 0,0014 mm	0,1862 ± 0,0017 mm
	d	5,9199 ± 0,5882 µm	6,3071 ± 0,4813 µm
	D/d	31,8249	29,5219
Sh BEV 20	D	0,1882 ± 0,0898 mm	0,1854 ± 0,0077 mm
	d	6,7125 ± 1,0453 µm	6,665475 ± 0,7476 µm
	D/d	28,0372	27,815
Op NaCl 0,9%	D	0,2288 ± 0,1238 mm	0,2441 ± 0,0446 mm
	d	7,5532 ± 0,3979 µm	5,545663 ± 1,3231 µm
	D/d	30,2918	44,0164
Op BEV 10	D	0,2708 ± 0,0832 mm	0,2389 ± 0,0303 mm
	d	7,2918 ± 1,5641 µm	5,8453 ± 1,1369 µm
	D/d	37,1376	40,8704
Op BEV 20	D	0,2942 ± 0,1256 mm	0,2531 ± 0,0593 mm
	d	5,93 ± 0,9705 µm	5,3453 ± 0,9853 µm
	D/d	49,6121	47,35

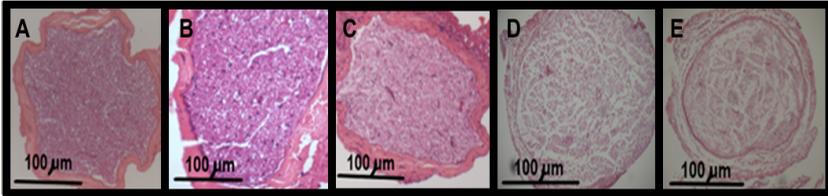
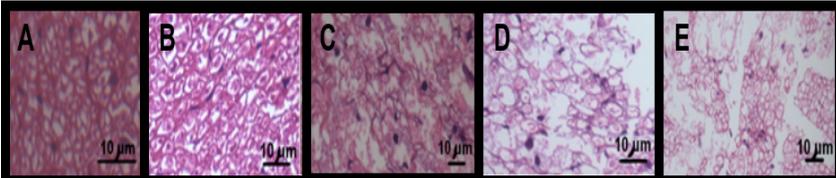
FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: mm = unidade de comprimento “milímetro”; µm = unidade de comprimento “micrômetro”; Sh NaCl 0,9% = grupo *sham* com solução salina isotônica; Sh BEV20 = grupo *sham* com solução bevacizumab 20 mg/kg; Op NaCl 0,9% = grupo operado com solução salina isotônica; Op BEV 10 = grupo operado com solução bevacizumab 10 mg/kg; Op BEV 20 = grupo operado com solução bevacizumab 20 mg/kg; D = média do diâmetro nervo mediano; d = média do diâmetro das fibras mielinizadas do nervo mediano; D/d = razão diâmetro nervo e diâmetro fibra entre os grupos; DP = desvio-padrão.

Alusivamente à análise qualitativa, observou-se no período de 3 dias (Figura 11) que os grupos *sham* não apresentaram alterações morfológicas caracterizadas por alteração da organização fascicular, aumento do número de células inflamatórias ou perda de fibras mielínicas. A droga tampouco produziu modificação da arquitetura do nervo no grupo *sham*. No grupo Op NaCl 0,9% ocorreu, entretanto, irregularidade e espessamento do perineuro, associado a infiltrado inflamatório moderado. Foi possível ainda notar uma perda da arquitetura axonal traduzida pelos dismorfismo e desorganização axonais das estruturas, somada à perda de axônios mielínicos maiores. Já no grupo Op BEV10 identificou-se espessamento do epineuro, com neovasos e discreto infiltrado inflamatório. O nervo também apresentou

perda dos axônios mielínicos maiores e visualizou-se figuras morfológicas axonais atípicas bem como houve perda do agrupamento fascicular. Por fim, no grupo Op BEV20 houve perda da população de axônios mielínicos maiores e apresentação de figuras morfológicas axonais atípicas e presença de moderado infiltrado inflamatório perineural, vasos de paredes finas, em porção proximal; bem como espessamento do perineuro e perda do padrão fascicular.

Ao se examinar o período de 21 dias (**Figura 12**) notou-se, de maneira semelhante ao encontrado naquele de 3 dias, que os grupos *sham* não desenvolveram alterações estruturais. Já o grupo Op NaCl 0,9% caracterizou-se por perda do perineuro em cerca de 15% da circunferência, em média, onde se identificou tecido colágeno mais denso e que invadia o endoneuro, associado à moderado infiltrado inflamatório epineural. Evidenciou-se ainda a perda da arquitetura fascicular, com desorganização dos axônios, que se encontravam circundados por fibra colágena cicatricial. Também se visualizou uma diminuição do número de axônios mielínicos de grande diâmetro. No grupo Op BEV10 percebeu-se a perda da estrutura do nervo com destruição do perineuro em cerca de 30% da circunferência, em média. Observou-se ainda perda da estrutura fascicular com desorganização e redução da população de axônios de maior calibre sendo notada a presença de células inflamatórias. Por fim, no grupo Op BEV20 se identificou um espessamento importante do epineuro, com aumento do colágeno e formação de neovasos. Houve ainda destacada perda da arquitetura fascicular e desorganização dos axônios, que se encontravam circundados por fibra colágena cicatricial onde se visualiza significativa diminuição dos axônios mielínicos de maior calibre.

PRANCHA 3 DIAS**Figura 11 - Secção transversal de nervo mediano de rato 3 dias após esmagamento (coloração HE)****100X****400X**

FONTE: o autor (2018).

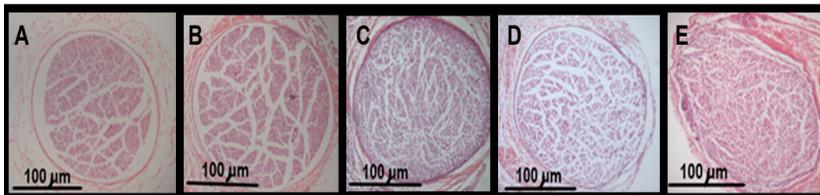
LEGENDA: A = grupo *sham* NaCl 0,9%; B = grupo *sham* bevacizumab 20 mg/kg; C = grupo operado NaCl 0,9%; D = grupo operado bevacizumab 10 mg/kg; E = grupo operado bevacizumab 20 mg/kg; µm = unidade de medida de comprimento "micrômetro".

NOTA: magnificação de 100x e 400x.

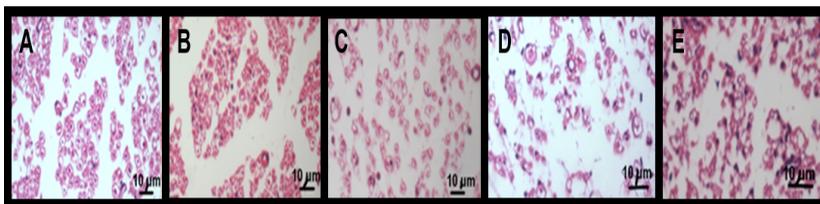
PRANCHA 21 DIAS

Figura 12 - Secção transversal de nervo mediano de rato 21 dias após esmagamento (coloração HE)

100x



400x



FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: A = grupo *sham* NaCl 0,9%; B = grupo *sham* bevacizumab 20 mg/kg; C = grupo operado NaCl 0,9%; D = grupo operado bevacizumab 10 mg/kg; E = grupo operado bevacizumab 20 mg/kg; µm = unidade de medida de comprimento “micrômetro”.

NOTA: magnificação de 100x e 400x.

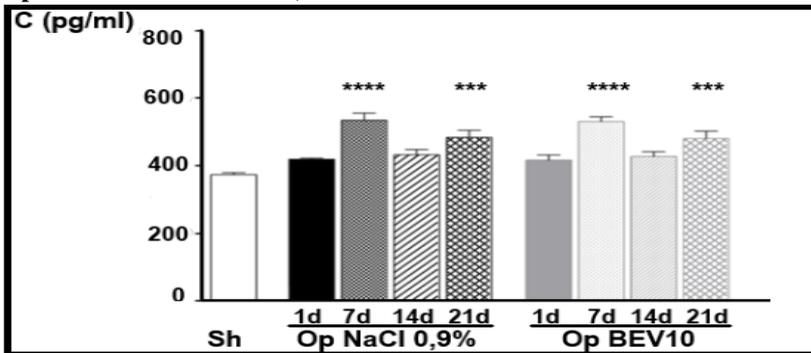
4.3 - BIOQUÍMICO (CONCENTRAÇÃO DE VEGF)

Analisou-se, ao longo do tempo, a expressão de VEGF entre animais submetidos à injúria tecidual por esmagamento em uso de anticorpo anti-VEGF-A, em dose de 10 mg/kg (Op BEV10) e se confrontou os valores com grupo em que se utilizou solução de NaCl 0,9% (Op NaCl 0,9%).

Para tanto, distribuiu-se os roedores nos períodos de 1, 7, 14 e 21 dias. Obteve-se os resultados a partir de ANOVA 1 via, Ordinário com análise *post hoc* por teste de Dunnet. Os valores de F (DFn, DFd) encontrados foram F (10, 22) = 18,00 (p < 0,0001). Expressou-se os dados pela média e erro padrão da média (SEM).

Ao se avaliar isoladamente os grupos, verificou-se um pico na concentração de VEGF no 7 ° dia. Ocorreu um decaimento no 14° dia e um novo aumento da concentração no 21° dia. O fenômeno se repetiu tanto no grupo em uso de salina isotônica quanto naquele em que se administrou o inibidor de VEGF (**Figura 13**).

Figura 13 - Avaliação temporal da concentração de VEGF intergrupos (relação grupos Sham com grupos Operados NaCl 0,9% e BEV 10 (valores expressos em Média ± SEM)



FONTE: o autor (2018)

LEGENDA: C = concentração; pg/ml = unidade de concentração “picograma por mililitro”; d = unidade de medida de tempo “dia”; Sh NaCl 0,9% = grupo *sham* com solução salina isotônica; Op NaCl 0,9% = grupo operado com solução salina isotônica; Op BEV 10 = grupo operado com solução bevacizumab 10 mg/kg; **** p < 0,0001; *** p < 0,001; SEM = Erro Padrão das Médias.

Descobriu-se ainda que a concentração deste fator de crescimento no grupo com bevacizumab apresentou níveis inferiores ao do grupo de animais em uso de salina isotônica quando comparamos o mesmo

período temporal. Este fenômeno foi observado ao longo de todo o período de 21 dias. Entretanto, estes resultados não se apresentaram significantes entre si, de modo que, apesar de a droga gerar uma inflexão negativa nos valores de VEGF, o impacto do bevacizumab na concentração de VEGF no tecido nervoso, pelo menos neste modelo de trauma, foi pequeno ou desprezível (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Comparação da concentração média de VEGF em cada intervalo de tempo (intergrupos Operados [Op NaCl 0,9% e Op BEV 10])

DIA/GRUPOS	Op NaCl 0,9%		Op BEV 10		P
	C (pg/ml)	IC	C (pg/ml)	IC	
1 dia	419,6	(414,6-424,6)	416,6	(390,6-442,6)	Ns
7 dias	534,6	(498,6-570,6)	530,6	(506,6-554,6)	Ns
14 dias	432,6	(406,6-458,6)	427,6	(402,6-452,6)	Ns
21 dias	483,6	(446,6-520,6)	480,6	(442,6-518,6)	Ns

FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: C = concentração; pg/ml = unidade de concentração “picograma por mililitro”; d = unidade de medida de tempo “dia”; Op NaCl 0,9% = grupo operado com solução salina isotônica; Op BEV 10 = grupo operado com solução bevacizumab 10 mg/kg; ns = valores não significativos; IC = intervalo de confiança de concentração.

NOTA: a concentração média do grupo *sham* com NaCl 0,9% foi 373,6 (362,6-384,6) pg/ml.

5. DISCUSSÃO

Os pacientes com câncer usualmente apresentam um aumento na incidência de quedas, que pode chegar a aproximadamente 50% naqueles com neoplasias malignas avançadas⁵. Sabe-se que o uso de quimioterápicos destaca-se como fator de risco preponderante para este acontecimento na população oncológica⁵. Deste modo, esse fenômeno é evidenciado pelo fato dos pacientes que apresentavam sintomas de NPIQ apresentarem 2,67 vezes mais propensão a relatar uma queda ou um evento de quase-queda em comparação àqueles sem sintomas de NPIQ⁷¹. Soma-se ao fato de que há uma reconhecida correlação entre a gravidade da neuropatia motora e quedas, com aproximadamente 12% dos pacientes com NPIQ apresentando essa ocorrência ao longo de um período de 3 meses⁷². Além disso, dados revelaram que a NPIQ moderada a grave não só dobrou a taxa de queda, mas também piorou a qualidade de vida e a independência funcional em sobreviventes de neoplasias malignas⁷³. Dentre as lesões neste grupo destaca-se a fratura de extremidades, que por sua vez pode ocasionar a lesão traumática de nervos periféricos (LTNP)⁷².

Como visto, uma vez que se estabelece o dano à estrutura nervosa, um processo reparador é iniciado. Neste novo cenário, o VEGF desempenha um papel de protagonismo na regeneração do nervo e conseqüente recuperação funcional. O presente trabalho resolveu estudar a ação do bevacizumab, uma droga originalmente desenvolvida para uso oncológico, cujo princípio de ação é baseado na supressão do crescimento tumoral, decorrente da inibição da angiogênese. Motivado pelo problema clínico exposto, realizou-se então este modelo experimental de trauma de nervo periférico, no intuito de avaliar as repercussões do uso deste medicamento no nervo.

Os resultados encontrados no presente estudo revelaram achados surpreendentes. Constatou-se inicialmente que os dados funcionais obtidos apresentariam confiabilidade. A garantia da homogeneidade da amostra foi evidenciada pela demonstração de não haver diferença na expressão de força entre todos os grupos no período basal (pré-lesão). Do mesmo modo, durante todo o experimento, procurou-se assegurar a transparência e reprodutibilidade⁷⁴ dos experimentos e, para isso, seguiu-se as diretrizes preconizadas pelo ARRIVE (do acrônimo Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments; em idioma português, Pesquisa Animal: Relato de Experimentos *In Vivo*) e método STAR (do acrônimo Structured, Transparent, Accessible Reporting; no vernáculo

lusitano, Relatórios Estruturados, Transparentes, Acessíveis), que são observadas por pesquisadores que realizam estudos experimentais no mundo todo⁷⁵⁻⁷⁷.

Neste sentido, sobressai-se em uma análise atenta, que não houve diferença nos grupos *sham* (NaCl 0,9% e BEV20) ao longo do tempo (**Figura 9**). Isto reflete que a droga não exerceria piora da força caso se mantivessem preservados a estrutura e os mecanismos fisiológicos do nervo. Todavia, há trabalhos demonstrando resultados controversos no papel do inibidor de VEGF⁷⁸⁻⁸⁰. Assim, uma recente publicação ressalta que o bevacizumab não aumentou acentuadamente a toxicidade quando usado em combinação com uma variedade de agentes quimioterápicos⁷⁸. Do mesmo modo, um trabalho experimental pré-clínico apontou melhora dos sintomas de comportamento de dor decorrentes da neuropatia por oxaplatina com a modulação do VEGF-A⁷⁹. Por outro lado, um estudo clínico de *coorte* indicou que este agente exacerbaria a neuropatia induzida por paclitaxel⁸⁰. Nossos achados em modelo experimental não observaram piora dos parâmetros funcionais em animais que fizeram uso de inibidor de VEGF. Pelo menos, quando o aspecto avaliado é a força, a droga aparentemente mostrou-se segura, não trazendo repercussões funcionais motoras ao ser usada isoladamente nos roedores.

Curiosamente, quando se expôs os animais a uma situação em que ocorreu destruição tecidual e perda dos mecanismos de homeostasia, como é o caso do trauma do nervo, a droga em diferentes doses (BEV10 ou BEV20) também não promoveu piora ou retardo do parâmetro funcional, ao serem confrontados roedores em uso de solução salina isotônica, submetidos ao mesmo modelo de lesão (**Figura 9**). Assim, consequente ao trauma tecidual, o presente estudo revelou que em todos os grupos operados (com ou sem aplicação da droga) aconteceu perda da capacidade funcional motora. Este fenômeno foi evidenciado pelo decaimento de maneira expressiva nos valores da força até o 14º dia, com resultados significantes estatisticamente quando comparados aos seus respectivos valores basais (**Figura 10**). Este evento deixou de ocorrer na semana subsequente, aos 21 dias de avaliação, quando se observou o retorno a padrões pré-lesão, o que refletia a recuperação da força em todos os grupos de animais que sofreram trauma tecidual. Este achado particularmente demonstra que a droga não promoveu retardo no retorno da função motora, independentemente da dose usada nos animais.

Para tanto, este resultado pode ser comparado com dados de trabalho que utilizou modelo de lesão por esmagamento de nervo mediano sem

uso do anti-VEGF⁶⁹. Este estudo revelou que a recuperação funcional, avaliada pelo teste de prensão já seria detectável no dia 12 e, progressivamente, aumentaria até o 28º dia, após o qual o desempenho do animal atingiria um platô até o final do teste (no dia 42), quando alcançaria valores cerca de 75-80% daqueles do pré-operatório⁶⁹.

Quando se confronta os resultados funcionais aos achados morfológicos no presente trabalho é possível se observar uma convergência das respostas do inibidor de VEGF frente ao trauma nos diferentes grupos, o que promoveu maior robustez ao impacto dos achados. Fundamentalmente, quanto à análise histológica, decidiu-se avaliar os padrões morfológicos em 2 momentos primordiais da resposta regenerativa do animal. Deste modo, a escolha do terceiro dia para análise histológica decorre da droga apresentar tempo de meia vida de aproximadamente 8 dias em ratos⁸¹, com pico de ação entre 1 e 3 dias. Associa-se também o fato do fenômeno de brotamento (mecanismo regenerativo da lesão por esmagamento) ser iniciado nos primeiros quatro dias após a lesão⁴¹. Já a segunda linha temporal foi escolhida devido ao retorno funcional se manifestar durante o final da segunda e início da terceira semana no modelo tipo esmagamento do nervo mediano⁶⁹. Além disso, no rato, o curso do evento de remoção dos resíduos de mielina e axônio por meio do processo de fagocitose dura, em média, 3 semanas⁷⁰.

Desta maneira, reenfaz-se a ausência de achados no grupo *Sh* BEV20, tanto no período de 3 como naquele de 21 dias, ratificando os resultados dos dados funcionais em que a droga não exerceu efeito quando o estado morfofisiológico se encontra preservado (**Tabela 3**). Já nos grupos pós-trauma (operados) observou-se que os nervos apresentaram aumento de sua espessura comparados aos grupos controles (*sham*) nos 2 intervalos de tempo avaliados (3 e 21 dias). É importante destacar, sobretudo, que especialmente no terceiro dia estas diferenças de dimensões tornaram-se mais evidentes (**Tabela 3**). Particularmente no primeiro curso de tempo, este evento pode provavelmente ser atribuído ao edema decorrente do processo inflamatório que se segue à injúria tecidual. A lesão do nervo periférico mudaria, portanto, a permeabilidade das barreiras físicas nos nervos periféricos, provocando alteração no microambiente local⁴⁰. Assim, com a quebra da BHN e consequente desequilíbrio da pressão no local decorrentes do trauma tecidual, sobrevém uma maior facilidade em induzir o edema da estrutura nervosa, uma vez que inexistente sistema linfático no espaço endoneural⁴⁰. Interessante salientar ainda que, na terceira semana, este padrão morfológico (maior diâmetro dos grupos submetidos ao esmagamento em relação ao *sham*) se mantém, apesar de

funcionalmente neste período os animais já manifestarem o retorno de sua função preênsil do segmento distal do membro torácico, como revelado previamente.

Já quando se analisa os diâmetros das fibras nervosas, observa-se fundamentalmente no 3º dia que as dimensões destas estruturas nos grupos operados foram maiores em relação ao grupos *sham* (**Tabela 3**). Pode-se atribuir este acontecimento novamente ao edema que se segue após o trauma, uma vez que estudos evidenciam aumentos da pressão do líquido endoneural de forma significativa já dentro de 90 minutos após o esmagamento do nervo ciático em roedores ⁴⁰. Estes mesmos autores relataram inclusive que no 10º dia se alcançou um pico cinco vezes maior que o nível inicial e que este se manteve em valores elevados até o dia 16, quando então declinava para o estado basal ⁴⁰. Entretanto, o que se encontrou no presente trabalho já no 21º dia (quando a ação da droga já teria deixado de existir), foi que os diâmetros das fibras dos grupos operados apresentaram valores próximos entre si. Ainda assim, essencialmente, suas dimensões eram notoriamente menores quando comparadas aos grupos *sham* (**Tabela 3**). Deste modo, o resultado observado neste período possivelmente poderia ser atribuído à redução da espessura da mielina que se segue após o mecanismo de trauma ⁶⁶. Sendo assim, estes achados da avaliação do parâmetro histomorfométrico estão em correspondência ao fato conhecido de que as fibras nervosas não conseguem retornar ao tamanho pré-cirúrgico, mesmo após tempos de recuperação prolongados ⁶⁶.

Por sua vez, quando se observam os aspectos qualitativos morfológicos nas pranchas de 3 e 21 dias (**Figuras 11 e 12**), encontra-se um achado particularmente importante de ausência de células polimorfonucleares em todos os grupos avaliados, tanto nos animais de 3 dias como naqueles de 21 dias. Evidencia-se, todavia, a presença de células mononucleares inflamatórias nos 2 períodos, essencialmente nos grupos que sofreram a injúria traumática. Isto decorre do recrutamento de neutrófilos manifestar-se precocemente após o insulto do nervo, ao passo que a infiltração por macrófagos neste ambiente usualmente se iniciar a partir do 2º ao 3º dias, com pico no 7º dia após a lesão ⁸². É importante destacar que a mielina e os detritos axonais são fagocitados nos primeiros dias pelas próprias células de *Schwann*, que tem este papel substituído posteriormente pelos macrófagos. Estas células inflamatórias entram através da BHN que se tornou permeável após o trauma e, então, realizam a maior parte deste processo. Essencialmente no rato, o curso temporal desses eventos é um período com duração de, pelo menos, três semanas, no qual os resíduos da mielina e do axônio

são removidos lentamente. Uma vez concluída esta etapa, os macrófagos deixam então o local da lesão ⁷⁰. Desta maneira, estas células leucocitárias desempenham uma função fundamental na regeneração nervosa e, juntamente com as células de *Schwann*, orquestram este processo reparativo ^{51-52; 55}.

Soma-se a este fato, o conhecido papel que o VEGF desempenha na regulação do novo crescimento dos axônios dos nervos periféricos danificados, uma vez que auxilia na recuperação das funções sensorial e motora após a lesão. Neste novo microambiente do nervo, os macrófagos migram para o espaço axonal, que agora está desprovido de axônios, e passam a secretar VEGF para induzir a formação de novos vasos sanguíneos. As células de *Schwann* passam então a utilizar esses vasos como trilhas para migrarem ao espaço axonal e, com isso, facilitar o novo crescimento axonal. Consequentemente, a distribuição exógena de VEGF nos nervos lesionados aumenta ainda mais a regeneração do axônio. Deste modo, o VEGF ampliaria a regeneração neuronal após a lesão tanto de forma indireta, por meio de mecanismos dependentes dos vasos sanguíneos bem como, possivelmente, de maneira direta ⁸³. Entretanto, como se pode observar, os achados revelados no presente trabalho não se refletiram em repercussão negativa dos aspectos funcionais com a inibição do VEGF em diferentes doses.

Os resultados morfológicos de todos os grupos operados no período de 3 dias reproduzem, portanto, o estado que se seguiu ao trauma do tecido nervoso. Como demonstrado, ocorreu neste intervalo de tempo a redução da capacidade funcional motora deste conjunto de animais. Sua análise qualitativa revelou notadamente uma redução da população de axônios mielínicos de grande calibre. Particularmente, deve-se lembrar que essas fibras de maior diâmetro (fibras A α) são aquelas responsáveis pelas vias motoras eferentes ⁴¹. A presença de células inflamatórias e a desorganização da organização fascicular, bem como o comprometimento da arquitetura do nervo, decorrente da descontinuidade de epineuro em graus variados, também expressam o dano promovido pela lesão traumática e que repercutem no teste de preensão neste período de 3 dias (**Figura 11**). Enquanto isso, no 21^o dia, um fenômeno curioso evidenciado foi a dicotomia dos achados funcionais com morfológicos neste espaço de tempo. Desse modo, apesar de todos os grupos de animais já apresentarem retorno da atividade preênsil do membro torácico após o dano, o mesmo não ocorreu nos achados morfológicos, que ainda revelam sinais de lesão e reparo tecidual (**Figura 12**). Notabiliza-se ainda, neste último período, que os grupos operados possuem a presença de fibra colágena cicatricial, que no caso

do modelo empregado (esmagamento) não comprometeu de forma significativa a recuperação funcional (**Figura 12**). A demonstração de um descompasso na reestruturação da arquitetura nervosa em comparação com sua funcionabilidade também é descrita em outros trabalhos como de Ronchi e cols ⁶⁹ que avaliaram animais aos 42 dias após a injúria do nervo e Muratori e cols ⁶⁶ que estudaram roedores no intervalo de 8 e 24 semanas. Deve-se reportar, todavia, que em ambas as obras empregou-se modelos de esmagamento do nervo mediano, porém sem o uso do inibidor de VEGF.

Destaca-se principalmente este último autor que, ao trabalhar com uma linha temporal mais longa, também demonstrou uma recuperação funcional rápida (em até 4 semanas). Apesar disso, os preditores morfológicos de regeneração (diâmetro do axônio, diâmetro da fibra, espessura da mielina e razão g) ainda não haviam retornado aos valores normais ao fim de 24 semanas, excetuando-se o número total de fibras ⁶⁶. Entretanto, um aspecto importante a ser salientado é que o processo regenerativo no modelo de axoniotmese, que foi adotado na presente pesquisa, assim como nestes trabalhos relatados, envolveu o fenômeno de brotamento ⁴¹. Deste modo, o surgimento de múltiplos brotos de axônios em cada um dos nervos esmagados ou transecionados no coto proximal é uma questão importante e que é frequentemente ignorada. Este fato pode, portanto, superestimar a quantidade de fibras que serão analisadas. Isto porque uma média de cerca de 5 axônios regenerados são emitidos a partir do coto do nervo proximal após uma lesão por esmagamento ⁷⁰. Um problema adicional complicador é que cada neurônio sensorial gera duas vezes mais ramos axônicos (aproximadamente 6) do que os motoneurônios (em torno de 3) ⁷⁰. Essa emissão de múltiplos axônios do coto proximal de um nervo lesionado pode, de fato, levar a conclusões equivocadas quando apenas contagens de axônios são feitas para avaliar a regeneração do axônio ⁷⁰. Conseqüentemente, muito embora a enumeração e a análise histomorfológica dos axônios regenerados serem utilizadas mais comumente como medidas de desfecho, já que geram uma grande quantidade de dados, estas devem ser analisadas com extremo critério. Desta maneira, se destaca a análise qualitativa, que complementa e norteia a avaliação morfométrica. Além disso, outros fatores podem repercutir na qualidade da transmissão e no retorno da função. Pode-se citar como exemplo a presença de tecido cicatricial que, por sua vez, é evidenciada por estudos tanto no SNP como no SNC ⁸⁴⁻⁸⁶, mas que no corrente estudo não trouxeram diferença entre os diferentes grupos.

Deve-se lembrar ainda que outros aspectos que não são somente padrões histomorfométricos estariam implicados no retorno funcional. Desta maneira, o retorno da função motora do membro lesionado poderia ocorrer mesmo com a inibição do VEGF. Isto pode ser justificado uma vez que a engenhosa maquinaria de regeneração do nervo periférico envolve também alguns outros importantes fatores tróficos, dentre eles fator de crescimento nervoso (NGF); fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); fator neurotrófico ciliar (CNTF); fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF); neurotrofina 4 (NT4); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), entre tantos outros^{38; 54} que exercem importantes ações na regeneração nervosa. Este último, assim como o VEGF, demonstra a perfeita simbiose existente entre os sistemas vascular e nervoso nesse processo regenerativo.

Uma vez que se observou uma convergência dos resultados morfológicos e funcional, seria importante observar a presença de VEGF dentro da estrutura nervosa. Isto demonstraria se a inibição deste fator de crescimento implicaria em modulação de sua concentração ao longo do tempo. Deste modo, ao se analisar isoladamente a curva temporal da concentração de VEGF obtida pelo método de ELISA dos grupos operados, identificou-se um aumento de valores no 1º dia, que atingiram um pico de concentração do VEGF no 7º dia. Isto é seguido por um decaimento no 14º dia e que, por sua vez, é então sucedido por um novo aumento da concentração no 21º dia (**Figura 13**). Evidencia-se ainda que este fenômeno se repetiu tanto no grupo em uso de salina isotônica quanto naquele em que se administrou o inibidor de VEGF em dose de 10 mg/kg. É importante enfatizar que estes resultados apresentaram forte significância estatística no 7º e 21º dias (**Figura 13**). Comparativamente, em um estudo recente, mas que não envolvia inibição de VEGF encontrou-se resultados interessantes. Naquele trabalho também se empregou um modelo de esmagamento de n. periférico de ratos, mas que avaliou a modulação da expressão de VEGF pelo método de *Western blot*. Os autores evidenciaram que o VEGF é fortemente identificado em condições de controle e também nos dias 1, 3 e 7 após a lesão por esmagamento, porém é detectável fracamente nos dias 15 e 30. Neste mesmo estudo a expressão do RNAm do VEGF aumentou significativamente no grupo esmagamento nos dias 1, 3 e 7 após a lesão, sendo que nos dias 15 e 30 apresentava valores próximos aos basais⁶⁷.

Por outro lado, na corrente pesquisa, destaca-se que a concentração deste fator de crescimento no grupo em uso de bevacizumab expressou valores inferiores ao do grupo de animais em uso de salina isotônica,

quando se compara o mesmo período temporal. Este fenômeno foi observado ao longo de toda curva do tempo no intervalo de 21 dias (**Tabela 4**). Entretanto, os valores não se apresentaram significantes entre si, refletindo que, apesar de a droga gerar uma inflexão negativa nos valores de VEGF, o impacto do bevacizumab na concentração de VEGF no tecido nervoso periférico, pelo menos neste modelo de trauma, foi pequeno ou desprezível. Estes achados apenas ratificaram os resultados encontrados no comportamento, demonstrando sua consonância com os resultados funcionais do teste de preensão.

A inclusão do grupo de animais denominado 1 dia nesta etapa origina-se da necessidade de se conhecer a expressão da concentração deste fator de crescimento em um momento chave na farmacocinética da droga, uma vez que o bevacizumab apresenta um tempo de meia vida curto no animal ⁸¹. Por outro lado, este período de 1 dia não traduziria importância para a avaliação de força, já que sabidamente os animais apresentariam incapacidade funcional decorrente da lesão provocada. Desta maneira, este intervalo de 1 dia não foi utilizado nos testes de preensão. Do mesmo modo, utilizou-se somente o grupo Op BEV10 por se saber previamente o comportamento do fármaco na dose determinada. Isto foi fundamentado em estudo que verificou ser o tempo de meia vida da droga de 8,8 dias para uma dose única de 10 mg/kg em ratos ^{18; 81}. Entretanto, o que se observou é que o uso do inibidor de VEGF-A não se traduziu em redução significativa da concentração de VEGF.

Deve-se salientar, contudo, que muito embora a identificação dos níveis plasmáticos e teciduais de VEGF-A sejam sugestivos, eles não servem como preditores específicos ou biomarcadores de resposta ao bevacizumab, pelo menos em se tratando de câncer ⁷⁸. Apesar disso utilizou-se a dosagem da concentração deste fator de crescimento como um controle da efetividade da ação da droga no local que sofreu dano tecidual neste modelo experimental de trauma.

Desta maneira, em comparação com estudos clínicos, a experimentação animal permite um melhor controle das variáveis que influenciam a regeneração e a recuperação, e a avaliação de novos procedimentos e abordagens terapêuticas. Os modelos animais também fornecem a aplicação de métodos objetivos para avaliar as fases iniciais e o curso da regeneração, e para investigar processos moleculares e celulares de uma maneira que não é possível em estudos clínicos ⁵³.

Nos estudos experimentais de lesão em SNP os roedores são os animais mais comumente usados em virtude de apresentarem melhor custo-benefício ⁴¹. Particularmente em estudos de regeneração do nervo, há

uma clara prevalência de utilização do rato ^{42;70}, uma vez que esta espécie apresenta uma distribuição de troncos nervosos similar aos seres humanos ⁴¹⁻⁴². A função do membro torácico do roedor é amplamente estudada no contexto da aprendizagem motora, plasticidade neural e recuperação de lesões ⁸⁷. Destacadamente, o modelo do n. mediano do rato apresenta a vantagem de não ser comprometido pelo comportamento de automutilação ou por alterações secundárias no sistema musculoesquelético que poderiam determinar perdas na amostra. Este fato impacta positivamente nos princípios norteadores dos 3R para pesquisa com animais, uma vez que reduz o número de animais necessários para a análise, mantendo a significância dos resultados ^{53; 88}. No tocante ao fármaco utilizado, o bevacizumab pode ser empregado em esquemas terapêuticos diversos, que divergem amplamente conforme a neoplasia desenvolvida, em doses que variam 5 a 15 mg/kg, com reaplicações a cada 2 ou 3 semanas ^{19; 21; 32}. A dose escolhida de 10 mg/kg foi baseada em trabalho atual em que se administrou a droga em animais por via intravenosa (IV) ⁸¹, bem como na média das doses habitualmente adotadas para quimioterapia em seres humanos, como relatado acima. Para os controles *sham* e operado, utilizou-se uma dose 2 vezes maior que o valor médio preconizado, no intuito de se avaliar os efeitos do fármaco em doses extremas, o que garantiu uma maior elegância na apresentação dos resultados. Como o objetivo do presente trabalho era essencialmente a avaliação da resposta inflamatória ao trauma em sua fase aguda, decidiu-se por realizar a aplicação de apenas 1 dose do medicamento. Este fato é estruturado por estudos recentes que revelaram ser o tempo de meia vida do fármaco no animal, normalmente, de 8,8 dias (para uma dose única de 10 mg/kg) ^{18; 81}. Enquanto isso, em humanos o valor estimado foi de 17,2 dias (para uma dose única de 5 mg/kg) ^{18; 81}. Importante se destacar ainda que as análises farmacocinéticas do bevacizumab demonstraram uma cinética linear em um intervalo de dose de 1 a 10 mg / kg em humanos ¹⁷. Por razões práticas, o bevacizumab foi administrado intraperitoneal (I.P.) porque relatos anteriores demonstraram que a distribuição desta droga e sua eficácia após injeção IP foram equivalentes ao da rota IV, uma vez que a biodisponibilidade sistêmica foi de 92,8% ⁸⁹. O presente trabalho apresenta limitações bem como fatores que complicariam a translação dos resultados obtidos neste estudo com roedores para sua aplicação na prática clínica. Dentre estes, destaca-se o fato de a taxa de regeneração do axônio poder ser mais lenta em humanos do que aquela que ocorre habitualmente em roedores ⁵². Porém, certamente a maior delas é a não utilização de Microscopia

Elettrônica (ME) para avaliação morfológica, o que restringe a visualização de certas estruturas, particularmente as fibras amielínicas. Entretanto, como o objetivo deste estudo era o de avaliar a resposta motora que se segue ao trauma, esta limitação pode ser compensada, uma vez que as fibras eferentes somatomotoras são, na sua totalidade, compostas por fibras mielínicas de grande calibre do tipo A α ⁹⁰. Deve-se lembrar ainda que o modelo de regeneração envolvido neste estudo ocorre essencialmente por brotamento colateral⁴¹. Sendo assim, a quantificação precisa das fibras também poderia estar prejudicada mesmo neste método de visualização.

Uma ampliação do trabalho aqui apresentado para aplicação em estudos futuros poderia envolver a avaliação do impacto do inibidor de VEGF na resposta álgica após o trauma do nervo periférico. Essencialmente, neste caso seria importante a utilização de ME para avaliação das fibras aferentes que carregam sensações nociceptivas, já que muitas destas são amielínicas. As fibras amielínicas (tipo C) são responsáveis por vias autonômicas pós-gangliônicas, de temperatura e de comportamento de dor. Há ainda fibras mielínicas que conduzem nocicepção, entretanto estas são de pequeno calibre, as chamadas A δ ⁹⁰.

Uma vez que, com este trabalho já se obteve o padrão de resposta desta droga isoladamente, outra possibilidade de extensão para pesquisas futuras poderia ser também a avaliação do bevacizumab em associação com outros quimioterápicos, sobretudo naqueles que notoriamente apresentam efeitos neurotóxicos no nervo periférico. Basicamente há seis grupos principais de substâncias que causam danos aos neurônios periféricos sensoriais e motores, resultando no desenvolvimento de NPIQ: os antineoplásicos à base de platina (com destaque para oxaliplatina e cisplatina), os taxanos (os quais sobressaem paclitaxel, docetaxel), os alcalóides da vinca (particularmente vincristina e vinblastina), os inibidores do proteassoma (bortezomida), as epotilonas (ixabepilona) e as drogas imunomoduladoras (como é o caso da talidomida)⁹¹⁻⁹². A avaliação do impacto destas combinações em modelo experimental certamente auxiliaria a compreensão da interação destas drogas, o que traria maior segurança em estudos com seres humanos.

Outro aspecto que poderia ser abordado em estudo futuro seria avaliar o impacto da idade sobre o processo de regeneração, uma vez que a senilidade poderia implicar em resposta de reparação diferente. Deste modo, a comparação entre animais jovens e aqueles idosos poderia trazer uma melhor compreensão na fisiopatologia da lesão de nervo

periférico. Estes achados seriam de grande relevância em decorrência da maior expectativa de vida da população.

Particularmente o presente estudo descobriu que o uso sistêmico de anticorpo do VEGF-A em animais que não apresentam lesão estabelecida no nervo não repercutiu em piora da força. Da mesma forma que a inibição do VEGF-A por bevacizumab, em modelo de lesão nervosa periférica, não se traduziu em retardo ou piora da recuperação funcional nas diferentes doses empregadas. Este achado é de inegável relevância, uma vez que na axotomia e na denervação muscular crônica, fatores neurotróficos reduzidos ou inadequados nas células de *Schwann* ou órgãos-alvo ao longo do tempo podem levar a desfecho funcional mais desfavorável⁵⁴. Mediante este fato, a luz do nosso conhecimento, não havia dados na literatura informando se, com o uso do inibidor do VEGF-A, ocorreria ou não atraso na reinervação do órgão alvo após o trauma do nervo.

Como demonstrado, a NIPQ é uma consequência relativamente comum e séria do tratamento do câncer, sendo muitas vezes a principal razão para a redução ou descontinuação desta terapia⁹³. Por o bevacizumab irrefutavelmente não resultar em piora dos aspectos funcionais, morfológicos ou bioquímicos neste modelo experimental, estes achados poderiam trazer futuramente grandes impactos em estudos clínicos frente ao tratamento de neoplasias.

Declaramos a não existência de conflito de interesse por parte dos pesquisadores envolvidos neste estudo.

6. CONCLUSÕES

6.1 - GERAL

O anticorpo anti-VEGF-A (bevacizumab) não implica em piora dos parâmetros funcionais, morfológicos ou bioquímicos em modelo de lesão por esmagamento de nervo mediano em ratos da linhagem *Wistar*.

6.2 - ESPECÍFICAS

(1) O uso sistêmico de anti-VEGF-A em animais que não apresentam lesão estabelecida no nervo não repercute em piora da força. Da mesma forma, a inibição do VEGF-A por bevacizumab em modelo de lesão nervosa periférica não traduz em retardo ou piora da recuperação funcional nas diferentes doses empregadas;

(2) Ocorre redução dos diâmetros do nervo e das fibras axonais mielinizadas após a lesão do nervo mediano nos grupamentos com e sem uso do anticorpo anti-VEGF-A. Apesar do grupo em uso de bevacizumab apresentar alterações qualitativas e desenvolver dimensões menores, não há diferença estatística significativa entre os grupos com droga e salina isotônica, dado este em consonância com os resultados funcionais;

(3) A concentração de VEGF no tecido nervoso periférico submetido à lesão varia temporalmente nos grupos salina isotônica (NaCl 0,9%) e bevacizumab 10 mg/kg. Entretanto, o efeito do inibidor de VEGF-A na modulação da expressão do VEGF no local da lesão não evidencia diferença entre estes grupos, fato que converge com a resposta funcional.

REFERÊNCIAS

1. Guirguis-Blake JM, Michael YL, Perdue LA, Coppola EL, Beil TL. Interventions to Prevent Falls in Older Adults: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2018 Apr 24;319(16):1705-16.
2. US Preventive Services Task Force, Grossman DC, Curry SJ, Owens DK, Barry MJ, Caughey AB, Davidson KW, Doubeni CA, Epling JW Jr, Kemper AR, Krist AH, Kubik M, Landefeld S, Mangione CM, Pignone M, Silverstein M, Simon MA, Tseng CW. Interventions to Prevent Falls in Community-Dwelling Older Adults: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*. 2018 Apr 24;319(16):1696-1704.
3. Tricco AC, Thomas SM, Veroniki AA, Hamid JS, Cogo E, Strifler L, Khan PA, Robson R, Sibley KM, MacDonald H, Riva JJ, Thavorn K, Wilson C, Holroyd-Leduc J, Kerr GD, Feldman F, Majumdar SR, Jaglal SB, Hui W, Straus SE. Comparisons of interventions for preventing falls in older adults: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2017 Nov 7;318(17):1687-99.
4. Winters-Stone KM, Horak F, Jacobs PG, Trubowitz P, Dieckmann NF, Stoyles S, Faithfull S. Falls, Functioning, and Disability Among Women With Persistent Symptoms of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *J Clin Oncol*. 2017 Aug 10;35(23):2604-12.
5. Wildes TM, Dua P, Fowler SA, Miller JP, Carpenter CR, Avidan MS, Stark S. Systematic review of falls in older adults with cancer. *J Geriatr Oncol*. 2015 Jan;6(1):70-83.
6. Bekelis K, Missios S, Spinner RJ. Falls and peripheral nerve injuries: an age-dependent relationship. *J Neurosurg*. 2015 Nov;123(5):1223-9.
7. Meyers EC, Granja R, Solorzano BR, Romero-Ortega M, Kilgard MP, Rennaker RL 2nd, Hays S. Median and ulnar nerve injuries reduce volitional forelimb strength in rats. *Muscle Nerve*. 2017 Dec;56(6):1149-54.

8. Vieira LS, Gomes AP, Bierhals IO, Farías-Antúnez S, Ribeiro CG, Miranda VIA, Lutz BH, Barbosa-Silva TG, Lima NP, Bertoldi AD, Tomasi E. Falls among older adults in the South of Brazil: prevalence and determinants. *Rev Saúde Públ.* 2018; 52:22.
9. Soares WJS, Moraes SA, Ferriolli E, Perracini MR. Fatores associados a quedas e quedas recorrentes em idosos: estudo de base populacional. *Rev Bras Geriatr Gerontol.* 2014;17(1):49-60.
10. Staff NP, Grisold A, Grisold W, Windebank AJ. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. *Ann Neurol.* 2017 Jun;81(6):772-81.
11. Guerard EJ, Deal AM, Williams GR, Jolly TA, Nyrop KA, Muss HB. Falls in Older Adults With Cancer: Evaluation by Oncology Providers. *J Oncol Pract.* 2015 Nov;11(6):470-4.
12. Ward PR, Wong MD, Moore R, Naeim A. Fall-related injuries in elderly cancer patients treated with neurotoxic chemotherapy: a retrospective cohort study. *J Geriatr Oncol.* 2014 Jan;5(1):57-64.
13. Rossi A, Gauvrit S, Marass M, Pan L, Moens CB, Stainier DYR. Regulation of VEGF signaling by natural and synthetic ligands. *Blood.* 2016 Nov 10;128(19):2359-66.
14. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Oct;17(10):611-25.
15. Xin H, Zhong C, Nudleman E, Ferrara N. Evidence for Pro-angiogenic Functions of VEGF-Ax. *Cell.* 2016 Sep 22;167(1):275-284.e6.
16. Sousa F, Cruz A, Fonte P, Pinto IM, Neves-Petersen MT, Sarmiento B. A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. *Sci Rep.* 2017 Jun 16;7(1):3736.
17. Markus R, Chow V, Pan Z, Hanes V. A phase I, randomized, single-dose study evaluating the pharmacokinetic equivalence of

biosimilar ABP 215 and bevacizumab in healthy adult men. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017 Oct;80(4):755-63.

18. Knight B, Rassam D, Liao S, Ewesuedo R. A phase I pharmacokinetics study comparing PF-06439535 (a potential biosimilar) with bevacizumab in healthy male volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016 Apr;77(4):839-46.

19. Wakelee HA, Dahlberg SE, Keller SM, Tester WJ, Gandara DR, Graziano SL. Adjuvant chemotherapy with or without bevacizumab in patients with resected non-small-cell lung cancer (E1505): an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017 Dec; 18(12):1610-23.

20. Han S, Hong Y, Liu T, Wu N, Ye Z. The efficacy and safety of paclitaxel and carboplatin with versus without bevacizumab in patients with non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017 Dec 23;9(18):14619-29.

21. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, Cortesi E, Tomasello G, Ronzoni M, Spadi R, Zaniboni A, Tonini G, Buonadonna A, Amoroso D, Chiara S, Carlomagno C, Boni C, Allegrini G, Boni L, Falcone A. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2014 Oct 23;371(17):1609-18.

22. Kuboki Y, Nishina T, Shinozaki E, Yamazaki K, Shitara K, Okamoto W, Kajiwarra T, Matsumoto T, Tsushima T, Mochizuki N, Nomura S, Doi T, Sato A, Ohtsu A, Yoshino T. TAS-102 plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies (C-TASK FORCE): an investigator-initiated, open-label, single-arm, multicentre, phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* 2017 Sep;18(9):1172-81.

23. Tomasello G, Petrelli F, Ghidini M, Russo A, Passalacqua R, Barni S. FOLFOXIRI Plus Bevacizumab as Conversion Therapy for Patients With Initially Unresectable Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis. *JAMA Oncol.* 2017 Jul 13;3(7):e170278.

- 24.** Wallin JJ, Bendell JC, Funke R, Sznol M, Korski K, Jones S, Hernandez G, Mier J, He X, Hodi FS, Denker M, Leveque V, Cañamero M, Babitski G, Koeppen H, Ziai J, Sharma N, Gaire F, Chen DS, Waterkamp D, Hegde PS, McDermott DF. Atezolizumab in combination with bevacizumab enhances antigen-specific T-cell migration in metastatic renal cell carcinoma. *Nat Commun.* 2016 Aug 30;7:12624.
- 25.** Gao X, McDermott DF. Combinations of Bevacizumab With Immune Checkpoint Inhibitors in Renal Cell Carcinoma. *Cancer J.* 2018 Jul/Aug;24(4):171-179.
- 26.** Wu YS, Shui L, Shen D, Chen X. Bevacizumab combined with chemotherapy for ovarian cancer: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncotarget.* 2017 Feb 7;8(6):10703-13.
- 27.** Coleman RL, Brady MF, Herzog TJ, Sabbatini P, Armstrong DK, Walker JL, Kim BG, Fujiwara K, Tewari KS, O'Malley DM, Davidson SA, Rubin SC, DiSilvestro P, Basen-Engquist K, Huang H, Chan JK, Spirtos NM, Ashfaq R, Mannel RS. Bevacizumab and paclitaxel-carboplatin chemotherapy and secondary cytoreduction in recurrent, platinum-sensitive ovarian cancer (NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study GOG-0213): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017 Jun;18(6):779-91.
- 28.** Shoji T, Komiyama S, Kigawa J, Tanabe H, Kato K, Itamochi H, Fujiwara H, Kamiura S, Hamano T, Sugiyama T; Japanese Gynecologic Oncology Group. An open-label, randomized, phase II trial evaluating the efficacy and safety of standard of care with or without bevacizumab in platinum-resistant epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer patients previously treated with bevacizumab for front-line or platinum-sensitive ovarian cancer: rationale, design, and methods of the Japanese Gynecologic Oncology Group study JGOG3023. *BMC Cancer.* 2018 Jul 31;18(1):771.
- 29.** Zielinski C, Láng I, Inbar M, Kahán Z, Greil R, Beslija S, Stemmer SM, Zvirbulė Z, Steger GG, Melichar B, Pienkowski T, Sirbu D, Petruzelka L, Eniu A, Nisenbaum B, Dank M, Anghel R, Messinger D, Brodowicz T; TURANDOT investigators.

Bevacizumab plus capecitabine as first-line treatment for HER2-negative metastatic breast cancer (TURANDOT): primary endpoint results of a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Sep;17(9):1230-9.

30. Trédan O, Follana P, Moullet I, Cropet C, Trager-Maury S, Dauba J, Lavau-Denes S, Diéras V, Béal-Ardisson D, Gouttebel M, Orfeuvre H, Stefani L, Jouannaud C, Bürki F, Petit T, Guardiola E, Becuwe C, Blot E, Pujade-Lauraine E, Bachelot T. A phase III trial of exemestane plus bevacizumab maintenance therapy in patients with metastatic breast cancer after first-line taxane and bevacizumab: a GINECO group study. *Ann Oncol.* 2016 Jun;27(6):1020-9.

31. Kim MM, Umemura Y, Leung D. Bevacizumab and Glioblastoma: Past, Present, and Future Directions. *Cancer J.* 2018 Jul/Aug;24(4):180-6.

32. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, Brandes AA, Taal W, Domont J, Idbaih A, Campone M, Clement PM, Stupp R, Fabbro M, Le Rhun E, Dubois F, Weller M, von Deimling A, Golfopoulos V, Bromberg JC, Platten M, Klein M, van den Bent MJ. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017 Nov 16;377(20):1954-63.

33. Gao X, Zhao Y, Stemmer-Rachamimov AO, Liu H, Huang P, Chin S, Selig MK, Plotkin SR, Jain RK, Xu L. SR, Jain RK, Xu L. Anti-VEGF treatment improves neurological function and augments radiation response in NF2 schwannoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 24;112(47):14676-81.

34. Zhang N, Chen J, Ferraro GB, Wu L, Datta M, Jain RK, Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov A, Xu L. Anti-VEGF treatment improves neurological function in tumors of the nervous system. *Exp Neurol.* 2018 Jan;299(Pt B):326-33.

35. Van Gompel JJ, Agazzi S, Carlson ML, Adewumi DA, Hadjipanayis CG, Uhm JH, Olson JJ. Congress of Neurological Surgeons Systematic Review and Evidence-Based Guidelines on Emerging Therapies for the Treatment of Patients With Vestibular Schwannomas. *Neurosurgery.* 2018 Feb 1;82(2):E52-E54.

36. Wick W, Hertenstein A, Platten M. Neurological sequelae of cancer immunotherapies and targeted therapies. *Lancet Oncol.* 2016 Dec;17(12):e529-e541.
37. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, Rodríguez-Abreu D, Moro-Sibilot D, Thomas CA, Barlesi F, Finley G, Kelsch C, Lee A, Coleman S, Deng Y, Shen Y, Kowanz M, Lopez-Chavez A, Sandler A, Reck M; IMpower150 Study Group. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med.* 2018 Jun 14;378(24):2288-301.
38. Palispis WA, Gupta R. Surgical repair in humans after traumatic nerve injury provides limited functional neural regeneration in adults. *Exp Neurol.* 2017 Apr;290:106-14.
39. Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, Di Scipio F, Tos P, Czaja K, Fornaro M. Chapter 3: Histology of the Peripheral Nerve and Changes Occurring During Nerve Regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 87:27–46.
40. Liu Q, Wang X, Yi S. Pathophysiological Changes of Physical Barriers of Peripheral Nerves After Injury. *Front Neurosci.* 2018 Aug 23;12:597.
41. Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin.* 2013 Aug;29(3):317-30.
42. Tos P, Ronchi G, Papalia I, Sallen V, Legagneux J, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Chapter 4: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I-experimental models. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:47-79.
43. Bertelli JA, Mira JC. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Methods.* 1995 May;58(1-2):151-5.
44. Bobkiewicz A, Cwykiel J, Siemionow M. Anatomic variations of brachial and lumbosacral plexus models in different rat strains. *Microsurgery.* 2017 May;37(4):327-33.

45. Simon NG, Spinner RJ, Kline DG, Kliot M. Advances in the neurological and neurosurgical management of peripheral nerve trauma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Feb;87(2):198-208.
46. Seddon HJ. Three types of nerve injuries. *Brain*. 1943 Dec;66(4):237-88.
47. Kaya Y, Sarikcioglu L. Sir Herbert Seddon (1903–1977) and his classification scheme for peripheral nerve injury. *Childs Nerv Syst*. 2015 Feb;31(2):177–80.
48. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951 Dec;74(4):491–516.
49. Kemp SW, Cederna PS, Midha R. Comparative outcome measures in peripheral regeneration studies. *Exp Neurol*. 2017 Jan;287(Pt3):348-57.
50. MacKinnon SE, Dellon AL. Classification of nerve injuries as the basis for treatment. In: MacKinnon SE, Dellon AL, editors. *Surgery of the peripheral nerve*. New York: Thieme; 1988:35–63.
51. Wood MD, Mackinnon SE. Pathways regulating modality-specific axonal regeneration in peripheral nerve. *Exp Neurol*. 2015 Mar;265:171-5.
52. Scheib J, Höke A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol*. 2013 Dec;9(12):668-76.
53. Navarro X. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: A critical overview. *Eur J Neurosci*. 2016 Feb; 43(3):271–86.
54. Jones S, Eisenberg HM, Jia X. Advances and Future Applications of Augmented Peripheral Nerve Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 7;17(9). pii: E1494.
55. Cattin AL, Lloyd AC. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 2016 Aug;39:38-46.

- 56.** Mackenzie F, Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development*. 2012 Apr;139(8):1371-80.
- 57.** Carmeliet P, Ruiz de Almodovar C. VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2013 May;70(10):1763-78.
- 58.** Guaiquil VH, Pan Z, Karagianni N, Fukuoka S, Alegre G, Rosenblatt MI. VEGF-B selectively regenerates injured peripheral neurons and restores sensory and trophic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec 2; 111(48): 17272–7.
- 59.** Zor F, Deveci M, Kilic A, Ozdag MF, Kurt B, Sengezer M, Sönmez TT. Effect of VEGF gene therapy and hyaluronic acid film sheath on peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 2014 Mar;34(3):209-16.
- 60.** Tovar-Y-Romo LB, Ramírez-Jarquín UN, Lazo-Gómez R, Tapia R. Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy. *Front Cell Neurosci*. 2014 Feb 28; 8:61.
- 61.** Keifer OP Jr, O'Connor DM, Boulis NM. Gene and protein therapies utilizing VEGF for ALS. *Pharmacol Ther*. 2014 Mar; 141(3):261–71.
- 62.** Stanojlovic M, Pang X, Lin Y, Stone S, Cvetanovic M, Lin W. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Exacerbates Loss of Lower Motor Neurons and Axons during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One*. 2016 Jul 28;11(7):e0160158.
- 63.** Acosta L, Morcuende S, Silva-Hucha S, Pastor AM, de la Cruz RR. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Prevents the Downregulation of the Cholinergic Phenotype in Axotomized Motoneurons of the Adult Rat. *Front Mol Neurosci*. 2018 Jul 12;11:241.
- 64.** Verheyen A, Peeraer E, Nuydens R, Dhondt J, Poesen K, Pintelon I, Daniels A, Timmermans JP, Meert T, Carmeliet P, Lambrechts D. Systemic anti-vascular endothelial growth factor

therapies induce a painful sensory neuropathy. *Brain*. 2012 Sep;135(Pt9):2629–41.

65. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(2):120–32.

66. Muratori L, Ronchi G, Raimondo S, Giacobini-Robecchi MG, Fornaro M., Geuna S. Can regenerated nerve fibers return to normal size? A long-term post-traumatic study of the rat median nerve crush injury model. *Microsurgery*. 2012 Jul;32(5):383–7.

67. Muratori L, Gnavi S, Fregnan F, Mancardi A, Raimondo S, Perroteau I, Geuna S. Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Family Member Expression After Peripheral Nerve Regeneration and Denervation. *Anat Rec (Hoboken)*. 2018 Oct;301(10):1646-56.

68. Cressey D. UK funders demand strong statistics for animal studies. *Nature*. 2015 Apr 16;520(7547):271-2.

69. Ronchi G, Nicolino S, Raimondo S, Tos P, Battiston B, Papalia I, Varejão AS, Giacobini-Robecchi MG, Perroteau I, Geuna S. Functional and morphological assessment of a standardized crush injury of the rat median nerve. *J Neurosci Methods*. 2009 Apr 30;179(1):51-7.

70. Gordon T, Borschel GH. The use of the rat as a model for studying peripheral nerve regeneration and sprouting after complete and partial nerve injuries. *Exp Neurol*. 2017 Jan;287(Pt 3):331-47.

71. Kolb NA, Smith AG, Singleton JR, Beck SL, Stoddard GJ, Brown S, Mooney K. The Association of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy Symptoms and the Risk of Falling. *JAMA Neurol*. 2016 Jul 1;73(7):860-6.

72. Gewandter JS, Fan L, Magnuson A, Mustian K, Peppone L, Heckler C, Hopkins J, Tejani M, Morrow GR, Mohile SG. Falls and functional impairments in cancer survivors with chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): a University of Rochester CCOP study. *Support Care Cancer*. 2013 Jul;21(7):2059-66.

- 73.** Bao T, Basal C, Seluzicki C, Li SQ, Seidman AD, Mao JJ. Long-term chemotherapy-induced peripheral neuropathy among breast cancer survivors: prevalence, risk factors, and fall risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Sep;159(2):327-33.
- 74.** Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature.* 2016 May 26;533(7604):452–4.
- 75.** Reichlin TS, Vogt L, Würbel H. The Researchers' View of Scientific Rigor-Survey on the Conduct and Reporting of In Vivo Research. *PLoS One.* 2016 Dec 2;11(12):e0165999.
- 76.** Glasziou P, Altman DG, Bossuyt P, Boutron I, Clarke M, Julious S, Michie S, Moher D, Wager E. Reducing waste from incomplete or unusable reports of biomedical research. *Lancet.* 2014 Jan 18;383(9913):267-76.
- 77.** Marcus E, whole Cell team. A STAR Is Born. *Cell.* 2016 Aug 25;166(5):1059-60.
- 78.** Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2016 Jun;15(6): 385–403.
- 79.** Di Cesare Mannelli L, Tenci B, Micheli L, Vona A, Corti F, Zanardelli M, Lapucci A, Clemente AM, Failli P, Ghelardini C. Adipose-derived stem cells decrease pain in a rat model of oxaliplatin-induced neuropathy: Role of VEGF-A modulation. *Neuropharmacology.* 2018 Mar 15;131:166-75.
- 80.** Matsuoka A, Maeda O, Mizutani T, Nakano Y, Tsunoda N, Kikumori T, Goto H, Ando Y. Bevacizumab Exacerbates Paclitaxel-Induced Neuropathy: A Retrospective Cohort Study. *PLoS One.* 2016 Dec 19;11(12):e0168707.
- 81.** Zhao YY, Wang N, Liu WH, Tao WJ, Liu LL, Shen ZD. Charge Variants of an Avastin Biosimilar Isolation, Characterization, In Vitro Properties and Pharmacokinetics in Rat. *PLoS One.* 2016 Mar 17;11(3):e0151874.

- 82.** Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol.* 2015 Nov;130(5):605-18.
- 83.** Lange C, Storkebaum E, Almodóvar CR, Dewerchin M, Carmeliet P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nat Rev Neurol.* 2016 Aug;12(8):439-54.
- 84.** Zhu D, Tapadia MD, MD, Palispis W, Luu M, Wang W, Gupta R. Attenuation of Robust Glial Scar Formation Facilitates Functional Recovery in Animal Models of Chronic Nerve Compression Injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2017 Dec 20;99(24):e132.
- 85.** Ohtake Y, Li S. Molecular mechanisms of scar-sourced axon growth inhibitors. *Brain Res.* 2015 Sep 4;1619: 22–35.
- 86.** Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O’Shea TM, Kawaguchi R, Coppola G, Khakh BS, Deming TJ, Sofroniew MV. Astrocyte scar formation aids CNS axon regeneration. *Nature.* 2016 Apr 14; 532(7598):195–200.
- 87.** Wong CC, Ramanathan DS, Gulati T, Won SJ, Ganguly K. An automated behavioral box to assess forelimb function in rats. *J Neurosci Methods.* 2015 May 15;246:30-7.
- 88.** Stöbel M, Rehra L, Haastert-Talini K. Reflex-based grasping, skilled forelimb reaching, and electrodiagnostic evaluation for comprehensive analysis of functional recovery-The 7-mm rat median nerve gap repair model revisited. *Brain Behav.* 2017 Sep 6;7(10):e00813.
- 89.** Shah DK, Veith J, Bernacki RJ, Balthasar JP. Evaluation of combined bevacizumab and intraperitoneal carboplatin or paclitaxel therapy in a mouse model of ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Oct;68(4):951-8.
- 90.** Yvon A, Faroni A, Reid AJ, Lees VC. Selective Fiber Degeneration in the Peripheral Nerve of a Patient With Severe Complex Regional Pain Syndrome. *Front Neurosci.* 2018 Apr 4;12:207.

- 91.** Starobova H, Vetter I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front Mol Neurosci.* 2017 May 31;10:174.
- 92.** Mahmoudpour SH, Bandapalli OR, da Silva Filho MI, Campo C, Hemminki K, Goldschmidt H, Merz M, Försti A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: evidence from genome-wide association studies and replication within multiple myeloma patients. *BMC Cancer.* 2018 Aug 15;18(1):820.
- 93.** Carozzi VA, Canta A, Chiorazzi A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: what do we know about mechanisms? *Neurosci. Lett.* 2015 Jun 2;596:90–107.

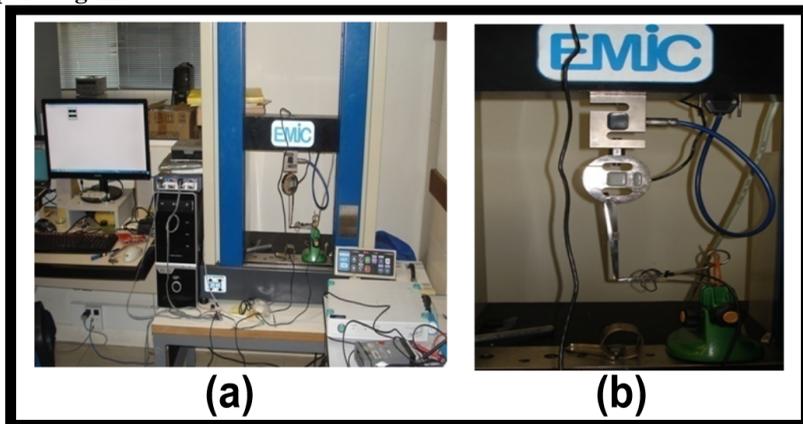
APÊNDICE

PROTOCOLO DE CALIBRAÇÃO DE INSTRUMENTAL PARA ESMAGAMENTO

Uma importante etapa deste experimento, no intuito de garantir sua reprodutibilidade foi a padronização e calibração do instrumental. Neste sentido, descrevemos pormenorizadamente as especificações técnicas e como isto foi realizado no Laboratório do Grupo de Análise e Projeto Mecânico (GRANTE), localizado no 1º andar do Bloco A3, do Departamento de Engenharia Mecânica (EMC), Centro Tecnológico (CTC), UFSC.

Utilizou-se a Máquina Universal para Ensaios Mecânicos em Materiais série *DL 3000*[®], EMIC / Instron (*São José dos Pinhais, PR, Brasil*) (**Figura 14A**), sendo a medição de força por meio de 2 células de carga intercambiáveis alinhadas em série (**Figura 14B**).

Figura 14 - Ensaio calibrado da força exercida em cada cremalheira pelo porta-agulhas *



FONTE: o autor (2018).

NOTAS: (a) Máquina Universal para Ensaios Mecânicos utilizada no procedimento; (b) Detalhe das células de carga com o instrumental sendo avaliado.

* Local do teste: laboratório GRANTE, Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC.

A primeira, modelo *Z 500*[®], Emic / Instron (*São José dos Pinhais, PR, Brasil*); a segunda, *RS 500*[®], Excel Sensores Indústria, Comércio e Exportação Ltda (*Taboão da Serra, SP, Brasil*) que transmitiram o sinal de carga mecânica e o sinal do porta-agulhas para o módulo de

aquisição de dados universais de 8 canais *HBM-QuantumX-Mx840b*[®], Hottinger Baldwin Messtechnik (HBM) GmbH - Spectris plc (*Darmstadt, HE, Alemanha*). A utilização de 2 sistemas de carga garante a sincronização entre os sinais obtidos dos sensores de deformação colados na carga e no porta agulhas para o módulo de aquisição de dados. A calibragem da máquina universal atende a norma *ABNT NM ISO 7500-1*.

Assim, para a compreensão deste mecanismo de funcionamento, deve-se conhecer uma propriedade estudada na Mecânica dos Sólidos que é a elasticidade. Para tanto, existe uma lei geral dos sistemas elásticos, que basicamente é uma extensão da lei do comportamento mecânico empregado à mola relatada por Robert Hooke em 1660. Esta lei geral, publicada pelo mesmo autor no ano de 1676, e aplicável a todo corpo que sofre deformação elástica é conhecida como LEI DA ELASTICIDADE ou LEI de HOOKE. Deste modo:

“As deformações elásticas sofridas pelos corpos são proporcionais às forças deformantes que são aplicadas sobre eles.”

Ela é expressa pela fórmula (**Equação 2**):

$$F = k \cdot \Delta l \quad (2)$$

onde:

F = força

k = constante da mola

Δl = deslocamento

Por conseguinte, esta lei também pode ser aplicada a materiais sólidos (desde que o limite elástico do material não seja excedido), o que é executado durante um ensaio de tração (como naquele realizado para a calibração do instrumental). Observa-se inicialmente um comportamento linear (durante a fase elástica), em que a tensão é proporcional à deformação do corpo, que é traduzida pela fórmula (**Equação 3**):

$$\sigma = E \cdot \epsilon \quad (3)$$

onde:

σ = tensão aplicada (grandeza tensorial física que representa os esforços internos dentro de um corpo)

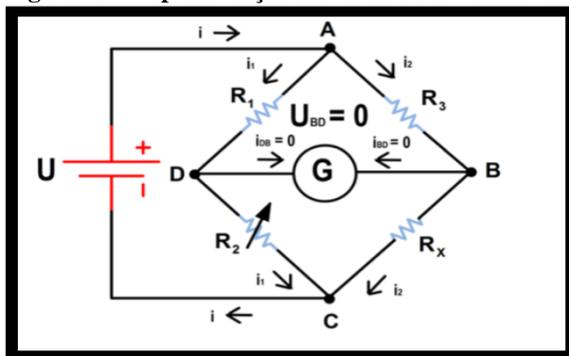
ϵ = deformação elástica longitudinal do corpo de prova

E = módulo de elasticidade (módulo de Young)

Para promover a leitura da deformidade mecânica neste sistema de provas foi afixado um transdutor nas faces de contato do porta-agulhas (corpo de prova), chamado de extensômetro. Este, por sua vez, desenvolve alteração de sua resistência ao sofrer a deformação juntamente com o instrumental. Entretanto, como a magnitude da deformação (ε) é sutil, estas variações de resistência apresentam valores muito pequenos. Para resolver este problema é utilizada uma ponte de Wheatstone (**Figura 15**). A ponte é considerada equilibrada quando os resistores estão ajustados de maneira que o detector de corrente (galvanômetro) estiver aferindo uma corrente igual a zero (**Equação 4**).

$$\text{Equilíbrio} \Rightarrow R_1 \cdot R_X = R_2 \cdot R_3 \quad (4)$$

Figura 15 - Representação da Ponte de Wheatstone



FONTE: o autor (2018), modificado a partir de figura obtida do sítio da Wikipedia*.

LEGENDA: i = corrente elétrica; U = diferença de potencial elétrico; R = resistência elétrica; G = galvanômetro.

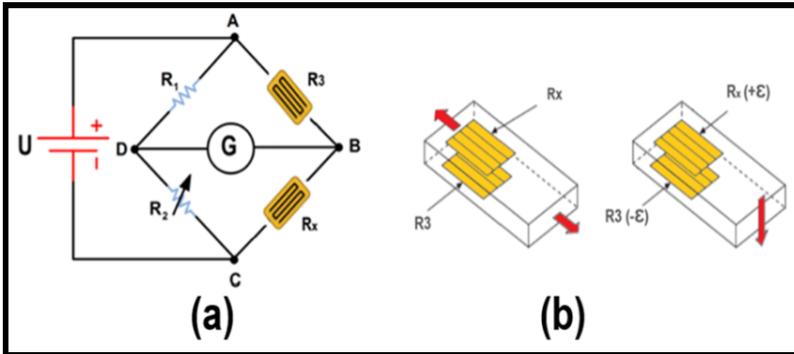
NOTA: * https://en.wikipedia.org/wiki/Bridge_circuit

Assim, para inferir a informação desejada (no caso a força exercida pelo porta-agulha), os resistores da ponte são trocados pelos extensômetros (**Figura 16**). Deste modo, uma variação na resistência devido à deformação mecânica gera uma tensão de saída diferente de zero.

Assim, se situação de:

- (1) *Equilíbrio*: não há variação da resistência $\Rightarrow U_{BD} = 0 \therefore R_1 / R_2 = R_3 / R_4$
- (2) *Desequilíbrio (deformidade)*: ocorrerá variação da resistência $\Rightarrow U_{BD} \neq 0$

Figura 16 - Esquema ilustrativo de extensômetro utilizado na calibração do instrumental



FONTE: o autor (2018), modificado a partir de figuras obtidas dos sites da Wikipedia * e National Instruments® **.

LEGENDA: i = corrente elétrica; U = diferença de potencial elétrico; R = resistência elétrica; G = galvanômetro; ε = magnitude da deformação.

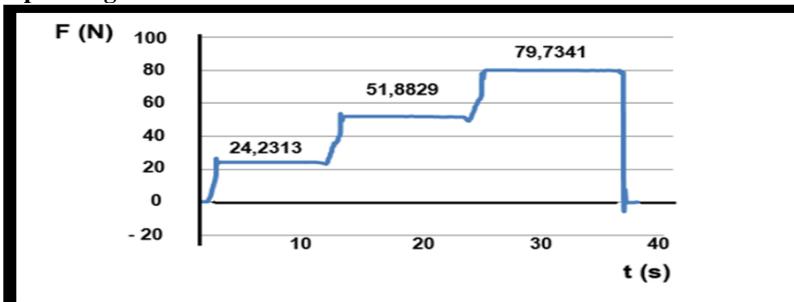
NOTAS: (a) Representação dos extensômetros na ponte de Wheatstone; (b) À esquerda, eixo axial rejeitado; à direita, eixo ortogonal sofrendo deformidade (extensômetro de meia ponte tipo II).

* https://en.wikipedia.org/wiki/Bridge_circuit

** <http://www.ni.com/white-paper/3642/pt/>

Essa variação na resistência é lida por outro dispositivo, sendo o sinal então encaminhado para o módulo de aquisição de dados. Este valor é então processado para obter o gráfico de tensão-deformação, que é gerado a partir da força exercida em cada dente da cremalheira do instrumental (**Figura 17**).

Figura 17 - Gráfico tensão-deformação obtido a partir do ensaio calibrado do porta-agulhas



FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: F = força; t = tempo; N = unidade de força "Newton"; s = unidade de tempo "segundo"; valores da esquerda para a direita, respectivamente, da primeira à terceira cremalheira.

No caso do instrumental utilizado neste experimento, observou-se uma força de 24,2313 N no primeiro dente da cremalheira. Já no segundo travamento, identificou-se uma força de 51,8829 N, ao passo que ao terceiro estágio, encontrou-se uma força de 79,7341 N (**Figura 17**). Como visto, no presente estudo, padronizou-se o travamento no primeiro dente do porta-agulhas como sendo a referência de pressão exercida sobre a estrutura nervosa.

ANEXOS

A - APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

Realizou-se este estudo respeitando-se os preceitos para minimizar a dor e o sofrimento dos animais, em conformidade com a resolução n° 714 de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Do mesmo modo, também esteve de acordo com a lei que regulamenta o uso de animais em experimentação no Brasil (Lei Arouca, n° 11.794, de 08/10/2008).

O projeto original foi aprovado em parecer do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o protocolo **PP 00910**, de 03 de Julho de 2014.

Figura 18 - Comprovação de aprovação do projeto de pesquisa à CEUA



FONTE: Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (2014).

B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE TRABALHO EM CONGRESSO

Os resultados iniciais dos valores morfológicos encontrados nesta pesquisa foram divulgados em Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), em sua XXXII edição, ocorrida em Campos do Jordão, SP, Brasil, no mês de Setembro, do ano de 2017.

Figura 19 - Comprovação de exposição de trabalho em Congresso

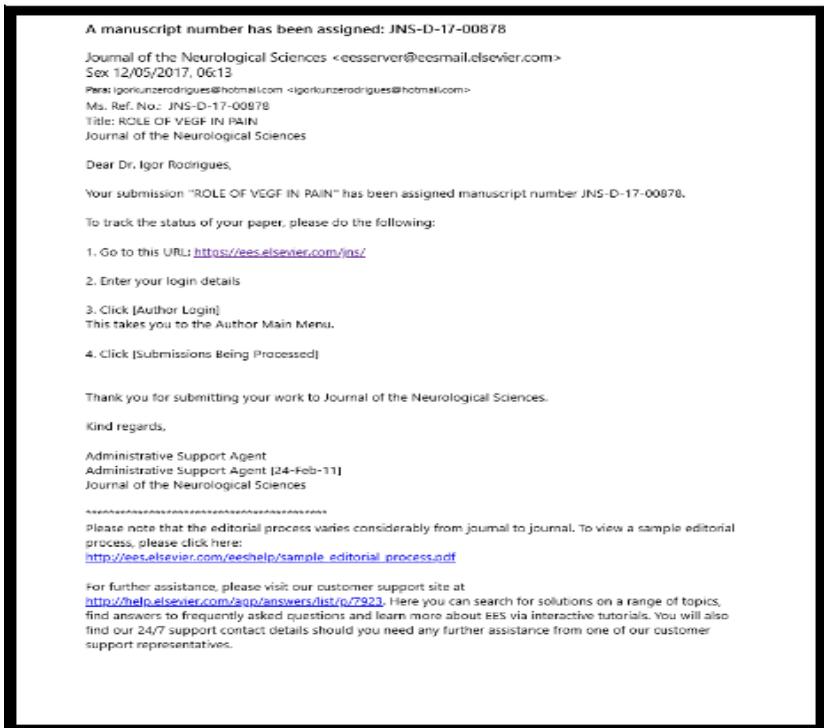


FONTE: Federação das Sociedades de Biologia Experimental (2017).

C - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO 1

O primeiro manuscrito, um **ARTIGO DE REVISÃO**, versa a respeito do papel do VEGF em aspectos da nocicepção e foi submetido ao periódico **JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES** (Ed. Elsevier), **ISSN: 0022-510X**, que apresenta fator de impacto (**FI**) de **2,448**. Trata-se, portanto, de uma revista científica classificada como **B1** para **MEDICINA I, II, III**, segundo modelo adotado pela Qualis CAPES. O número de referência da submissão do manuscrito neste periódico é **JNS-D-17-00878**.

Figura 20 - Comprovação de submissão do primeiro artigo à revista científica

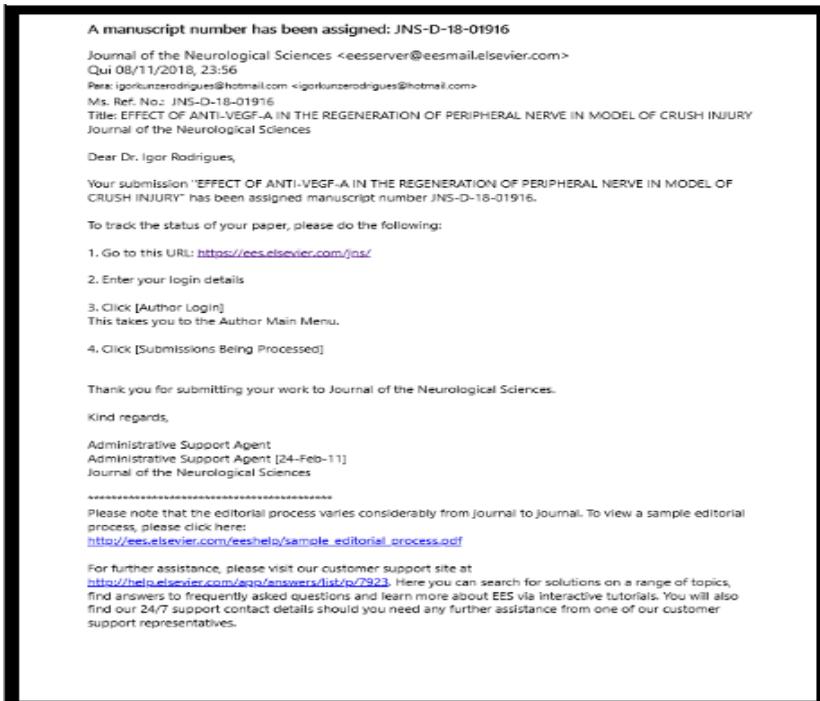


FONTE: Journal of Neurological Sciences (2017).

D - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO 2

O segundo artigo, um **TRABALHO DE PESQUISA EXPERIMENTAL**, foi submetido ao mesmo periódico, **JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES** (Ed. Elsevier), **ISSN: 0022-510X**, que como relatado anteriormente apresenta fator de impacto (**FI**) de **2,448**. De acordo com os critérios adotados pela CAPES, o torna um jornal classificado como **B1** para **MEDICINA I, II, III**. O conteúdo do manuscrito aborda os interessantes achados comportamentais e histológicos desta pesquisa relacionados à inibição do VEGF, em um modelo de trauma do nervo periférico. O número de referência da submissão do artigo nesta revista é **JNS-D-18-01916**.

Figura 21 - Comprovação de submissão do segundo artigo à revista científica



FONTE: Journal of Neurological Sciences (2018).

E - ARTIGO CIENTÍFICO 1 (VERSÃO LÍNGUA INGLESA)

ROLE OF VEGF IN PAIN

Rodrigues IK ¹, Martins BBP ², Karvat J ², Lyra Jr HF ¹, Duarte ECW ³, d'Acampora AJ ⁴, dos Santos ARS ².

1. Department of Surgery, UFSC
2. Department of Physiology, UFSC
3. Department of Morphology, UFSC
4. Department of Surgery, UNISUL

ABSTRACT

Worldwide prevalent diseases such as arthritis, diabetes, cancer are associated with the development of chronic pain. Chronic pain (CP) is a highly debilitating condition and has major impacts on the well-being of patients and their overall quality of life. However, effective treatments for chronic pain are still unmet, with lack of direct research while clinical needs increase. Nevertheless, recent investigations have reported that angiogenic growth factor VEGF-A plays a key role on the modulation of nociception and the onset of chronic pain¹. Understanding these VEGF-related signaling events can be an important step on the comprehension and treatment of chronic pain, well as on the prevention of sensory neuronal damage.

Key words: VEGF; pain; neuroprotection; analgesia.

1. INTRODUCTION

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a family of homodimeric glycoproteins linked to disulfide bridge¹⁻³. In mammals, the following members comprise the VEGF family: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and placental growth factor (PlGF)¹⁻³. VEGF-A, VEGF-B and PlGF exist in different isoforms and VEGF-C and VEGF-D are proteolytically processed to a mature form¹⁻³. In addition, proteins that are structurally related to VEGFs exist in parvovirus (VEGF-E) and snake venom (a group of proteins known as VEGF-F)⁴. VEGF is a primary activator of angiogenesis since it is one of the most specific and potent mitogens for endothelial cells^{5,6}. VEGF gene expression has been shown to be upregulated following hypoxia signaling, oxidative and mechanical stress, glucose deprivation and mutations on expression of oncogenes such as *Ras* and *Myc* in cancer cells^{5,6}.

2. VEGF HISTORY

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) has its history started in the year 1983 when Senger and Dvorak⁷ identified a "Vascular Permeability Factor" (VPF) from the partial purification performed in a Conditioned medium from a line of tumor

cells of guinea pigs (*Cavia porcellus*). However, since VPF was not isolated and sequenced, this factor remained molecularly unknown at that time. In 1989 the Ferrara-led laboratory⁸ reported the isolation of the "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF) - an endothelial cell-specific mitogen - from a bovine (*Bos taurus*) pituitary mediated-cell. Also in this same year, the Connolly group⁹, following the work of Senger^{et al.}, independently reported the isolation and sequencing of VPF. Subsequently, through cloning of VEGF and VPF cDNA from the two research groups, VEGF and VPF were shown to be the same molecule¹⁰. This was an important finding, since it demonstrated that a single vascular agent could have multiple functions.

The decade of 1990s was prolific in discoveries about VEGF. In 1991 alternative splicing of VEGF was discovered by Tischer¹¹. The year of 1993 brought the discovery that VEGF binds to a tyrosine kinase receptor (*Fik-1* or VEGFr-2)¹². In the same decade, another VEGF binding tyrosine kinase receptor (*Flt-1* or VEGFr-1)¹³ was recorded, and it has been shown that this receptor is fundamental for embryonic angiogenesis¹⁴⁻¹⁷. In 1995 the role of VEGF in the normal vascular development (physiological hypoxia) and in vessel survival was reported. The relationship between blood vessels, VEGF and astrocytes was also described¹⁸⁻¹⁹. Subsequently, in the year of 1997 Jeltsch's work²⁰ demonstrated the role of VEGF-C and VEGFr3 signaling in lymphangiogenesis. In 1998 neuropilin-1 (NRP1) was identified as an additional receptor for VEGF and not related to *Flt-1* and *Fik-1* tyrosine kinase receptors, as previously thought²¹.

A new stage of VEGF research was reached in 1999 when Sondell, Lundborg, and Kanje reported that on dorsal and cervical ganglion neuron culture VEGF promotes both axonal growth and cell survival by a VEGFr-2 dependent mechanism²².

Furthermore, in the first decade of this millennium evidence of the role of VEGF in the Nervous System was strengthened. For example, VEGF promotes the proliferation, migration, differentiation and survival of neuroblasts^{23,24,25} and induces the axonal growth of several neurons²⁶. VEGF has also been shown to cause increase in the number of neurites in cultured neurons or cortical explants²⁷ or length²⁸, which involved signaling through VEGFr-2, MAPK and PI3K/Akt. It was further observed that through VEGF chemoattraction occurs the migration of granular cells into the cerebellum via VEGF receptor type *Fik1* (VEGFr2)²⁹. VEGF also regulates neuronal migration through binding to Neuropilin-1 (NRP1)³⁰. Initially discovered to bind to some class 3 semaphorins (Sema 3), NRP1 was later identified as a *Fik1* (VEGFr2) co-receptor that also binds to VEGF^{21,31}. The binding of VEGF to NRP1 controls the migration of somites from neurons of facial motor branches, whereas the interaction of Sema 3A with an NRP1 / Plexin A4 complex guides its axons³². VEGF role in cell growth was observed through studies involving *Fik1*, which regulated neuron axon growth after binding of Sema 3E to a NRP1 / Plexin D1 complex that activates *Fik1* (VEGFr2) in the absence of VEGF³³. Finally, was demonstrated³⁴ that VEGF improves survival of cultured spinal cord motor neurons from wild-type mice as well as in mice with a mutation at hypoxia responsiveness site to VEGF (VEGF δ / δ). Its protective effect on motor neurons,

like most of its other neuronal effects, was mediated by VEGFr-2 and appeared to involve an NRP1 co-receptor³⁴.

3. VEGF EXPRESSION STRUCTURE AND ISOFORMS

Structure of VEGF

VEGF is a 45 kDa dimeric glycosylated cytokine belonging to the growth factor family, which has in its structure a set of disulfide bonds called the cystine knot. VEGF, whose expression is regulated mainly by hypoxia, exerts its biological activity mainly on the primary endothelial cells³⁵. The gene encoding human VEGF-A is organized into eight exons, separated by seven introns¹⁰. VEGF is a family which in mammals includes VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and placental growth factor (PlGF)¹⁻³. VEGF has significant homology with the A and B chains of the Derived Platelet Growth Factor (PDGF)¹⁰. Structurally, VEGFs have covalent intra and interchain disulfide bonds between eight cystine residues in conserved positions⁴. The crystal structure of VEGF-A revealed two monomers that are organized in an antiparallel fashion to form a dimer, with the receptor binding sites located at each pole of the dimer⁴. VEGFs preferentially form homodimers, although VEGF-A and PlGF heterodimers have been identified⁴. VEGF-A, VEGF-B and PlGF exist in different isoforms and VEGF-C and VEGF-D are proteolytically processed to a mature form².

VEGF-A Expression Isoforms

VEGF-A presents different isoforms that are generated by alternative splicing of mRNA exons from a single 8 exon gene³⁶. In humans, the protein displays 121, 145, 165, 183, 189 and 206 amino acids, being designated VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A183, VEGF-A189 and VEGF-A206. Mouse isoforms (*Mus musculus*) have a shorter amino acid residue than the corresponding human isoform, and are designated VEGF-A120, VEGF-A164, VEGF-A188 and VEGF-A205^{1,3,4,37}. Four major isoforms can be highlighted – VEGF-A121, VEGF-A165, VEGF-A189 and VEGF-A206. VEGF-A121 lacks the residues encoded by exons 6 and 7, while VEGF-A165 is the predominant and a physiologically important isoform, which has no residues encoded by exon 6. Less frequent alternative splicing has also been reported, including VEGF-A145, VEGF-A183, VEGF-A162¹⁰. There is a novel family of human VEGF-A splice variants (VEGF_{xxx})³⁸, formed by alternative splicing downstream of the conventional exon 8 in what was thought to be the 3' untranslated region (3' UTR) of the VEGF gene, resulting in the new open reading frame exon 8b³⁹⁻⁴⁰. Studies have revealed the occurrence of VEGF-A splice variants: VEGF-A165b³⁸, VEGF-A121b⁴¹, VEGF-A189b⁴² and VEGF-A145b⁴³. The VEGF-A_{xxx}a and VEGF-A_{xxx}b isoforms have the same number of amino acids, but with different C-terminal sequences⁴⁰. It has been proposed that this isoform VEGF-A_{xxx}b, especially VEGF-A 165b, would promote the down regulation of VEGFr activity⁴. The relative proportion of different VEGF-A isoforms varies in different tissues, since it plays specific roles during the final stages of vascular development, which relates to their differential affinity for the extracellular matrix and several VEGF-A receptors³. The bioavailability of VEGF is regulated by alternative splicing³. In

addition, extracellular proteolysis may play an important role in the regulation of bioavailability of VEGF where plasmin and matrix metalloproteinase-9 (MMP) are prominent¹⁰. Biochemical assays have shown the human VEGF-A189 isoform, with its two heparin binding domains, is retained in the extracellular matrix after secretion because of its high affinity for heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), whereas VEGF-A165, which contains only a heparin binding domain, is partially bound to the matrix and partially diffusible; VEGF-A121 does not have heparin binding domains and is the most diffusible isoform^{3,36-37}. The diffusion of the isoforms is thought to reflect their differential affinity for the heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) in the extracellular matrix, although genetic or physiological evidence is still lacking that HSPGs are essential for VEGF-A isoform-induced signaling events^{3,36-37}. In addition, several shorter diffusible forms (*i.e.*, VEGF-A110) are generated as a result of processing by extracellular matrix metalloproteinases³⁶.

4. VEGF RECEPTORS

VEGFr Family

VEGFRs are members of the RTK superfamily and belong to the same subclass as receptors for PDGFs and fibroblast growth factors (FGFs). VEGFRs are equipped with an extracellular domain with a residue of approximately 750 amino acids, which is arranged in seven folds similar to immunoglobulin (Ig)^{4,36}. Three VEGF receptor tyrosine kinases (RTK) have been identified as VEGFR1 (also known as tyrosine kinase 1 or *flt1* type *fms*); VEGFR-2, (referred to as a receptor containing an inserted kinase domain, KDR in human or fetal hepatic kinase-1, *flk1* in mice); And VEGFR-3 (*flt4*)^{1-2,44}. Members of the VEGF family also bind to the non-tyrosine kinase receptors of the neuropilin family (NRP), NRP1 and NRP2 (also receptors for semaphorins), which are considered to function as coreceptors for VEGFRs.² Members of the VEGF family bind to different cell surface receptors with different affinities and selectivities^{1-2,36}. Thus, VEGF-A, VEGF-B and PlGF bind VEGFR-1 (Flt-1); VEGF-A and VEGF-E bind to VEGFR-2, and VEGF-C and VEGF-D bind to VEGFR-3. The proteolytic processing of human VEGF-C and VEGF-D allows binding to VEGFR-2 (KDR); however, these factors bind to VEGFR-2 with lower affinity than to VEGFR-3. VEGF-F interacts with VEGFR-1 and VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and PlGF bind to NRP1; VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D and PlGF bind to NRP2^{1-2,36}. When only the VEGF-A isoforms was observed, it was noticeable that all VEGF-A isoforms bind to the transmembrane tyrosine kinase receptors VEGFR-1 (*flt-1*) and VEGFR-2 (*flk-1* in mice or KDR in humans). The non-tyrosine kinase receptors NRP1 and NRP2 bind preferentially to VEGF-A165, and possibly VEGF-A189, and in VEGF-A121 endotelic cells also bind to VEGFR-1^{3,37}.

VEGF binds with high affinity to the extracellular domain of tyrosine kinase receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2). VEGF binding induces receptor dimerization and autophosphorylation of the intracellular kinase domain. Phosphorylated tyrosines are anchoring sites for the assembly of multiprotein complexes, which initiate different intracellular cascades that terminate the activation of target cells³⁵. As a

result of receptor activation and subsequent signal transduction, VEGF target cells may proliferate, migrate or change the gene expression ³⁶.

Regulation of VEGFr activity

The activity of RTK is regulated by the availability of linkers. A particular feature of the VEGF-A ligand is the dramatic over-regulation of its expression levels under hypoxic conditions ^{4,35-36}. VEGFr-1 expression is upregulated by hypoxia via a hypoxia inducible factor-1 dependent mechanism and that VEGFr-1 not only binds VEGF-A, but also PlGF and VEGF-B. PlGF binds with high affinity to VEGFr-1, but is not essential for normal vasculogenesis and angiogenesis ^{4,35-36}. The role of VEGFr-1 is still under debate, however it is assumed that VEGFr-1 can not primarily be a receptor that transmits a mitogenic signal but a decoy receptor, which is able to negatively regulate the activity of VEGF in the vascular endothelium by sequestration and making this factor less available to VEGFr-2 ^{4,35-36}. VEGFr-2 is involved in all aspects of normal and pathologic vascular endothelial biology (stimulates endothelial cell proliferation, migration and survival, induces vascular permeability, actin remodeling and angiogenesis), whereas VEGFr-3 is important for the development and function of lymphatic endothelial cells. ^{4,35-36}

VEGFr would also be involved in the pain mechanism. The work of Selvaraj *et al* ⁴⁵ showed that VEGFRs are expressed in Peripheral Sensory Nerves and their Cell Organs in Dorsal Root Ganglia (DRG) and there is also a modulation of nociception by VEGF-A. In DRG cultures enriched by neurons VEGF-A induced ERK 1/2 phosphorylation, indicating that expressed VEGFr and sensory neurons are functionally active. Mechanical and thermal hyperalgesia evoked by intraplantar VEGF-A was blocked by intraplantar pretreatment with antibody against the extracellular domain of VEGFr-1. The systemic application of VEGFr-1 (MF-1) antibody significantly attenuated the development of nociceptive hypersensitivity in a cancer-inducing oncology model of bone pain. The authors suggest that the activation of VEGFr-1 in sensory neurons triggers functional and structural remodeling since VEGFr-1 activated several kinases, such as PLC γ , PI3K and Src kinase, which sensitize heat transducers, pressure and chemical stimuli in nociceptive terminals, such as TRPV1 and TRPA1, as well as efferent excitability amplifiers such as Na v1.8. Despite its role in angiogenesis, VEGFr-2 does not contribute to nerve sensitization ⁴⁵.

5. VEGF FUNCTIONS

General Aspects and Pathophysiological Implications

VEGF acts on a wide variety of cell types and has a wide range of functions. Well-characterized VEGF functions include stimulation of angiogenesis, monocyte chemotaxis, vascular permeability, and vasodilation ¹. The expression of VEGF occurs widely during embryogenesis. In adults, the well-characterized physiological roles of VEGF include angiogenesis during the female reproductive cycle, wound healing, and bone repair ¹. However, there are also a number of well-known pathophysiological effects of VEGF, including roles in tumor angiogenesis,

rheumatoid arthritis (RA), psoriasis, atherosclerosis, cerebral edema, age-related macular degeneration, diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, and sepsis¹. VEGF-A promotes the growth of vascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo¹. The role of VEGF-B is unknown, but may play a role in maintaining the newly formed blood vessels during pathological conditions. It may also be important for the protection of neurons in the retina. VEGF-C and VEGF-D are primarily involved in VEGFR-3 mediated lymphangiogenesis³⁶.

VEGF and its action on SNC development.

Recently, several lines of in vivo experimentation have demonstrated direct and essential roles for VEGF-A in the regulation of neural progenitor proliferation, survival, migration, axonal / dendritic standardization, and synaptic function³. The role in migration has been revealed in studies demonstrating that VEGF-A directly regulates the migration of differentiated neurons regardless of their roles in neurogenesis or blood vessel growth. The first study showed that NRP1-specific isoforms signaling VEGF-A signals the cell body (soma) of FBM neurons in the developing brainstem³⁰. A more recent study has shown that altering the gradients of the VEGF-A isoform or overall levels of VEGF-A also regulates neuronal migration²⁹. Recent studies on axonal orientation have brought physiological evidence that VEGF-A plays a role of directly guiding the CNS axons in vivo⁴⁶⁻⁴⁷. VEGF has a role in neuronal survival and survival pathways involved the coactivation of phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling in an NRP1-dependent manner⁴⁸. Neuroplasticity study revealed that VEGF-A increases synaptic strength independently of neurogenesis and angiogenesis to promote hippocampal-dependent memory formation⁴⁹.

VEGF has been shown to attract growth cones and increase growth rate. These effects are mediated through different VEGF receptors. For example, NRP1 is the corresponding receptor that is indispensable for the development of the optic chiasm, where it directs axon growth and crossing⁴⁶. Other studies have shown that VEGFR2 is responsible for orientation of the growth cone directed in chicken DRG growth cones⁵⁰⁻⁵¹. Recently, VEGFR3 has been discussed as being important during brain development, since this receptor is highly expressed during early stages of development in forebrain rat neurons, but receptor expression decreases throughout development⁵². Due to the high diversity of receptors expressed in different neuronal tissues, the cooperating receptors and even alternations in the levels of expression of these different receptors at different stages of development are important to understand the cellular mechanisms of VEGF stimulation downstream of the receptors⁵².

6. VEGF AND PAIN MECHANISM

VEGF is also involved in the mechanism of pain and inflammation. VEGF and VEGFr-2 are increased in the dorsal root ganglion (DRG) after peripheral nerve injury and are involved in the transmission of neuropathic pain mediated by the P2X_{2/3} receptor in DRG⁵³.

Evidence supports VEGF as a major regulator of neuronal function, independent of its vascular actions. In sensory systems, VEGF and VEGFR2 are present in primary sensory neurons in the dorsal root ganglia and spinal cord⁵⁴. In primary sensory neurons, VEGF is a neurotrophic factor, supporting axonal growth and regeneration, has neuroprotective effects and is highly elevated in response to injury of sensory neurons in rodent models of neuropathic pain⁵⁴. VEGF has been implicated in nociception since the administration of VEGF165 results in hyperalgesia and allodynia and the abolition of VEGF signaling attenuates neuropathic pain, indicating that high VEGF contributes to neuropathic pain⁵⁴. Clinical findings that VEGF-A contributes to pain are supported by observations that inhibition of VEGF 2 receptor (VEGFR-2) exacerbates peripheral neuronal damage, which is often associated with pain⁵⁵⁻⁵⁶ and increases pain behaviors in normal, nervous and diabetic animals⁵⁶. Particularly in diabetic neuropathy, the loss of intraepidermal nerve fibers and the severity of pain are related to the degree of decreased expression of VEGF and VEGFR-2, suggesting a relationship between VEGF-A and diabetic neuronal damage⁵⁷.

Studies have shown that neuroprotection would depend on the activation of VEGFR-2 and MEK1 / 2 but not on the activation of p38 or phosphatidylinositol 3-kinase⁵⁵. Recombinant human VEGF-A165b is a neuroprotective agent that effectively protects peripheral and central neurons in vivo and in vitro through VEGFR2, MEK1 / 2 and inhibition of caspase-3 induction. VEGF-A165b may be therapeutically useful for pathologies involving neuronal damage, including hippocampal neurodegeneration, diabetic retinopathy of glaucoma⁵⁵. The therapeutic potential of VEGF has already been demonstrated in peripheral neuropathies caused by diabetes or chemotherapy⁵⁸. However, work by Nestic *et al*⁵⁹ revealed that exogenous administration of VEGF-A165 significantly increased the incidence of pain development after spinal cord injury (SCI). Spontaneous allodynia due to SCI was associated with an increased abundance of myelinated axons and that exogenous VEGF-A additionally increased the aberrant appearance of myelinated axons, we conclude that increases in endogenous VEGF-A contribute to the development of SCI pain, excessive growth of myelinated axons, especially in the regions of pain processing. Another possible mediator of the effect of VEGF-A165 on SCI pain is amplified glial activation, since VEGF is known to induce glial activation⁵⁹.

Neuropathic pain results from neuroplasticity in nociceptive neural networks. A recent study demonstrated that the control of pre-mRNA alternative splicing through serine-arginine-rich splicing factor 1 (SRF1) is an integral part of the processing of nociceptive information in the spinal cord⁶⁰. Serine arginine protein kinase 1 (SRPK1) is the main route of activation of SRSF1⁶⁰.

Sensory neurons have the innate ability to adapt to stress during disease, such as diabetes or peripheral nerve trauma, by which central sensitization is induced in the spinal cord. It was showed that the expression of VEGF-A_{xxx}a (exon8a target) is dependent on the alternative splicing of protein kinase serine arginine protein type1 (SRPK1) -serine arginine splice factor (SRSF1) in a number of pathologies as well as chronic pain states⁶⁰⁻⁶¹. Inhibition of SRPK1 prevents the expression of

VEGF-A_{xxx}a and therefore leads preferentially to an increased proportion of the anti-nociceptive isoform VEGF-A_{xxx}b, promoting inhibition of chronic pain⁶⁰⁻⁶².

VEGF-A165a and VEGF-A165b have opposite effects on murine model pain. Expression of pro-nociceptive VEGF-A_{xxx}a within the spinal cord was increased after nerve damage, and this was prevented by the inhibition of SRPK1⁶⁰⁻⁶¹. Additionally, the expression of anti-nociceptive isoforms VEGF-A_{xxx}b was elevated, which was associated with reduced neuropathic pain behaviors⁶⁰⁻⁶¹. In the SNP, VEGF-A165a sensitizes peripheral nociceptive neurons through actions on VEGFr-2 and a TRPV1-dependent mechanism, thus enhancing nociceptive signaling⁶⁰⁻⁶¹. VEGF-A165b blocks the effect of VEGF-A165a. After nerve damage, the endogenous balance of VEGF-A isoforms changes to a higher expression of VEGF-A_{xxx}a compared to VEGF-A_{xxx}b, through a SRPK1-dependent pre-mRNA splicing mechanism⁶⁰⁻⁶¹. Pharmacological inhibition of SRPK1 after traumatic nerve injury selectively reduced VEGF-A_{xxx}a expression and reversed associated neuropathic pain. Exogenous VEGF-A165b also improved neuropathic pain⁶⁰⁻⁶¹.

Inhibition of VEGFR2 signaling in the spinal cord attenuated behavioral nociceptive responses to mechanical, heat and formalin stimuli, indicating that activation of spinal VEGFr-2 has potent pro-nociceptive actions. In addition, intrathecal VEGF-A165a resulted in mechanical and heat hyperalgesia, whereas the sister inhibitory isoform VEGF-A165b resulted in anti-nociception⁶⁰.

An important aspect involved in the pathogenesis of neuropathic pain is the epigenetic mechanism. It is known that currently these mechanisms may depend on the expression not only of chemokines but also of VEGF⁶⁰⁻⁶¹. One study has shown that accumulation of circulating leukocytes mediates the development and maintenance of neuropathic pain⁶⁰⁻⁶¹. Bone marrow-derived neutrophils and macrophages have been shown to be recruited to the injured peripheral nerves and produce various inflammatory cytokines, such as interleukins and chemokines, including MIPs (MIP-1 α , MIP-1 β and MIP-2). These mediators are essential components of peripheral sensitization, leading to neuropathic pain. Also in this study, the main sources of positive regulation of VEGF-A in the injured peripheral nerve were neutrophils and macrophages, showing their role in neuropathic pain. It was observed that VEGFr-1 was expressed in accumulating macrophages and proliferating endothelial cells. Conversely, VEGFr-2 was localized to endothelial cells, but not to macrophages. Data suggest that the VEGF pathway is involved in neuropathic pain behaviors through VEGFr-1 and VEGFr-2, which are localized to CD31 + endothelial cells and F4 / 80 + macrophages⁶³⁻⁶⁴.

Finally, we highlight recent findings relating pain and tumor growth that reveal the interesting relationship of opioid pain receptor *k* (KOR) with VEGF and the process of tumor angiogenesis. Oncologic pain is still a challenge for professionals working in this area. The work of Koddie *et al*⁶⁵ showed that morphine suppresses tumor angiogenesis through the inhibition of hypoxia-inducible transcription factors, which increases the expression of VEGF and VEGF receptors⁶⁵. Another study found that *k*-opioid peptides (KOR) acted as novel anti-angiogenic modulators by suppressing the expression of VEGF, VEGFr-2 and NRP1

receptors during vascular differentiation through inhibition of cAMP / PKA signaling⁶⁰⁻⁶¹. In another work KOR agonists have been shown to have potential as angiogenic antitumor modulators by inhibition of VEGFr-2 expression⁶⁷. Opioid systems are present mainly in neural tissues and could be involved in mechanisms of neuronal plasticity involved in chronic pain.

CONCLUSION

Although the discovery and developments of VEGF related nervous system treatment is recent, the growing knowledge about this growth factor has demonstrated an interesting potential for drug and treatment development. Besides being classically considering angiogenic factors, VEGF and VEGF receptors have ample action on the CNS and peripheral nerves, acting as modulators on brain development, inflammation and neuroprotection. The large and variable VEGF receptor family determines the ambiguous and sometimes opposite reactions modulated by VEGF. Although considered a challenge on the past decades, the discovery of VEGFr subfamilies leads to flexible approaches to multifactorial diseases, such as chronic pain.

REFERENCES

1. Hamilton JL, Nagao M, Levine BR, Chen D, Olsen BR, ImHJ. Targeting VEGF and Its Receptors for the Treatment of Osteoarthritis and Associated Pain. *J Bone Miner Res.* 2016 May;31(5): 911-24.
2. Carmeliet P, Ruiz de Almodovar C. VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2013 May;70(10):1763-78.
3. Mackenzie F, Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development.* 2012 Apr;139(8):1371-80.
4. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 May;7(5): 359-71.
5. Shih T, Lindley C. Bevacizumab: An Angiogenesis Inhibitor for the Treatment of Solid Malignancies. *ClinTher.* 2006 Nov;28(11):1779-802.
6. Yamamizu K, Furuta S, Hamada Y, Yamashita A, Kuzumaki N, Narita M, Doi K, Katayama S, Nagase H, Yamashita JK, Narita M. κ Opioids inhibit tumor angiogenesis by suppressing VEGF signaling. *Sci Rep.* 2013 Nov 14;3:3213.
7. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983 Feb 25;219(4587):983-5.
8. Leung DW, Cachianes G, KuangWJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989 Dec 8;246(4935):1306-9.
9. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989 Dec 8;246(4935):1309-12.

10. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 May;3(5):391-400.
11. Tischer E; Mitchell R; Hartman T; Silva M; Gospodarowicz D; Fiddes JC; Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991 Jun 25;266 (18):11947-54.
12. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Möller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 1993 Mar 26;72(6):835-46.
13. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995 Jul 6;376(6535):66-70.
14. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995 Jul 6;376(6535):62-6.
15. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996 Apr 4;380(6573):435-9.
16. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 1996 Apr 4;380(6573):439-442.
17. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl AcadSci U S A.* 1998 Aug 4;95(16):9349-54.
18. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity *Nat Med.* 1995 Oct;1(10):1024-8.
19. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci.* 1995 Jul;15(7 Pt 1):4738-47.
20. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science.* 1997 May 30;276(5317):1423-5.
21. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 1998 Mar 20;92(6):735-45.
22. Sondell M., Lundborg G. & Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 1999;19(14):5731-40.

23. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl AcadSci U S A*. 2002; 99(18):11946–11950.
24. Wittko IM, Schänzer A, Kuzmichev A, Schneider FT, Shibuya M, Raab S, Plate KH. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J Neurosci*. 2009; 29(27):8704–14.
25. Zhang H, Vutskits L, Pepper MS, Kiss JZ. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol*. 2003; 163(6):1375–84.
26. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev*. 2009; 89(2):607–48.
27. Rosenstein JM, Mani N, Khaibullina A, Krum JM. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons. *J Neurosci*. 2003 Dec 3;23(5): 11036–44.
28. Khaibullina AA, Rosenstein JM, Krum JM. Vascular endothelial growth factor promotes neurite maturation in primary CNS neuronal cultures. *Brain Res Dev Brain Res*. 2004 Jan 31;148(1):59-68.
29. Ruiz de Almodovar C, Coulon C, Salin PA, Knevels E, Chounlamountri N, Poesen K, Hermans K, Lambrechts D, Van Geyte K, Dhondt J, et al. Matrix-Binding Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Isoforms Guide Granule Cell Migration in the Cerebellum via VEGF Receptor Flk1. *J Neurosci*. 2010; 30(45):15052–66.
30. Schwarz Q, Gu C, Fujisawa H, Sabelko K, Gertsenstein M, Nagy A, Taniguchi M, Kolodkin AL, Ginty DD, Shima DT, Ruhrberg C. Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with *Sema3A* to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes Dev*. 2004; 18(22):2822–34.
31. Schwarz Q, Ruhrberg C. Neuropilin, you gotta let me know: should I stay or should I go? *Cell Adh Migr*. 2010 Jan-Mar;4(1):61–6.
32. Schwarz Q, Waimey KE, Golding M, Takamatsu H, Kumanogoh A, Fujisawa H, Cheng HJ, Ruhrberg C. Plexin A3 and plexin A4 convey semaphorin signals during facial nerve development. *Dev Biol*. 2008 Dec 1; 324(1):1–9.
33. Bellon A, Luchino J, Haigh K, Rougon G, Haigh J, Chauvet S, Mann F. VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron*. 2010 Ap 29; 66(2):205–219.
34. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudenbach V, Vermylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nature Genet*. 2001;28:131–138.
35. Finetti F, Basile A, Capasso D, Di Gaetano S, Di Stasi R, Pascale M, Turco CM, Ziche M, Morbidelli L, D'Andrea LD. Functional and pharmacological characterization of a VEGF mimetic peptide on reparative angiogenesis. *Biochem Pharmacol*. 2012 Aug 1;84(3):303-11.

36. Chong V. Biological, preclinical and clinical characteristics of inhibitors of vascular endothelial growth factors. *Ophthalmologica* 2012;227Suppl 1:2–10.
37. Rosenstein JM, Krum JM, Ruhrberg C. VEGF in the nervous system. *Organogenesis*. 2010 Apr-Jun; 6(2) 107–114.
38. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ. VEGFA165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is downregulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2002 Jul 15; 62(14):4123–31.
39. Harris S, Craze M, Newton J, Fisher M, Shima DT, Tozer GM, Kanthou C. Do Anti-Angiogenic VEGF (VEGFxxx) Isoforms Exist? A Cautionary Tale. *PlosOne*. 2012 May 2;7(5): e35231.
40. Bates DO, Mavrou A, Qiu Y, Carter JG, Hamdollah-Zadeh M, Barratt S, Gammons MV, Millar AB, Salmon AHJ, Oltean S, Harper SJ. Detection of VEGF-Axxx Isoforms in Human Tissues. *PLoS ONE*. 2013 Jul 31;8(7): e68399.
41. Renne E, Varey AHR, Churchill AJ, Wheatley ER, Stewart L, Mather S, Bates DO, Harper JS. VEGF121b, a new member of the VEGFxxx family of VEGF-A splice isoforms, inhibits neovascularisation and tumour growth in vivo. *Br J Cancer*. 2009 Sep 29;101(7):1183–93.
42. Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP. 5-Aza-29-deoxycytidine increases the expression of anti-angiogenic vascular endothelial growth factor 189b variant in human lung microvascular endothelial cells. *Biomed Pharmacother*. 2008 Mar;62(3): 158– 63.
43. Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia*. 2005 Nov;48(11): 2422–27.
44. Lin J, Li G, Den X, Xu C, Liu S, Gao Y, Liu H, Zhang J, Li X, Liang S. VEGF and its receptor-2 involved in neuropathic pain transmission mediated by P2X_{2/3} receptor of primary sensory neurons. *Brain Res Bull*. 2010 Oct 30;83(5):284–91.
45. Selvaraj D, Gangadharan V, Michalski CW, Kurejova M, Stösser S, Srivastava K, Schweizerhof M, Waltenberger J, Ferrara N, Heppenstall P, Shibuya M, Augustin HG, Kuner R. A Functional Role for VEGFR1 Expressed in Peripheral Sensory Neurons in Cancer Pain. *Cancer Cell*. 2015 Jun 8;27(6):780–96. Erratum in: *Cancer Cell*. 2015 Aug 10;28(2):270.
46. Erskine L, Reijntjes S, Pratt T, Denti L, Schwarz Q, Vieira JM, Alakakone B, Shewan D, Ruhrberg C. VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. *Neuron*. 2011 Jun 9;70(5):951–65.
47. Ruiz de Almodovar C, Fabre P J, Knevels E, Coulon C, Segura I, Haddick PC, Aerts L, Delattin N, Strasser G, Oh WJ, Lange C, Vinckier S, Haigh J, Fouquet C, Gu C, Atilalo K, Castellani V, Tessier-Lavigne M, Chedotal A, Charron F, Carmeliet P. VEGF mediates commissural axon chemoattraction through its receptor Flk1. *Neuron*. 2011 Jun 9;70(5):966–78.
48. Cariboni, A., Davidson, K., Dozio, E., Memi, F., Schwarz, Q., Stossi, F., Parnavelas, J. G. and Ruhrberg, C. VEGF signalling controls GnRH neuron survival via

- NRP1 independently of KDR and blood vessels. *Development*. 2011 Sep 1;138(17):3723-33.
49. Licht, T., Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Zubedat, S., Eavri, R., Segal, M., Yirmiya, R. and Keshet, E. Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proc Natl AcadSci USA*. 2011 Mar 22;108(12): 5081-6.
50. Foehring D, Brand-Saberi B, Theiss C. VEGF-induced growth cone enhancement is diminished by inhibiting tyrosine-residue 1214 of VEGFR-2. *Cells Tissues Organs*. 2012;196(3):195–205.
51. Olbrich L, Foehring D, Happel P, Brand-Saberi B, Theiss C. Fast rearrangement of the neuronal growth cone's actin cytoskeleton following VEGF stimulation. *Histochem Cell Biol*. 2013 Mar;139(3):431–45.
52. Ward MC, Cunningham AM. Developmental expression of vascular endothelial growth factor receptor 3 and vascular endothelial growth factor C in forebrain. *Neuroscience*. 2015 Sep 10;303:544–57.
53. Li X, Li G, Xu H, Tang X, Gao Y, Xu C, Liu S, Xie J, Tu G, Peng H, Qiu S, Liang S. Effects of anti-rVEGF on the expression of VEGF receptor-2 and P2X_{2/3} receptors of the spinal dorsal horn in neuropathic pain rats. *Brain Res Bull*. 2012 Feb 10;87(2-3):227-33.
54. Oltean S, Gammons M, Hulse R, Hamdollah-Zadeh M, Mavrou A, Donaldson L, Salmon AH, Harper SJ, Lodomery MR, Bates DO. SRPK1 inhibition in vivo: modulation of VEGF splicing and potential treatment for multiple diseases. *BiochemSoc Trans*. 2012 Aug;40(4): 831-5.
55. Beazley-Long N, Hua J, Jehle T, Hulse RP, Dersch R, Lehrling C, Bevan H, Qiu Y, Lagrèze WA, Wynick D, Churchill AJ, Kehoe P, Harper SJ, Bates DO, Donaldson LF. VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective splice isoform of vascular endothelial growth factor A in vivo and in vitro. *Am J Pathol*. 2013 Sep;183(3):918-29.
56. Verheyen A, Peeraer E, Nuydens R, Dhondt J, Poesen K, Pintelon I, Daniels A, Timmermans JP, Meert T, Carmeliet P, Lambrechts D. Systemic anti-vascular endothelial growth factor therapies induce a painful sensory neuropathy. *Brain*. 2012 Sep; 135(Pt 9): 2629-41.
57. Hulse RP, Beazley-Long N, Ved N, et al. Vascular endothelial growth factor-A165b prevents diabetic neuropathic pain and sensory neuronal degeneration. *ClinSci (London)*. 2015 Oct 1; 129(8): 741–56.
58. Verheyen A, Peeraer E, Lambrechts D, Poesen K, Carmeliet P, Shibuya M, Pintelon I, Timmermans JP, Nuydens R, Meert T. Therapeutic potential of VEGF and VEGF-derived peptide in peripheral neuropathies. *Neuroscience*. 2013 Aug 6;244:77-89.
59. Nestic O, Sundberg LM, Herrera JJ, Mokkaapati VU, Lee J, Narayana PA. Vascular endothelial growth factor and spinal cord injury pain. *J Neurotrauma*. 2010 Oct; 27(10):1793-803.
60. Hulse RP, Drake RA, Bates DO, Donaldson LF. The control of alternative splicing by SRSF1 in myelinated afferents contributes to the development of neuropathic pain. *Neurobiol Dis*. 2016 Dec;96:186-200.

61. Hulse RP, Beazley-Long N, Hua J, Kennedy H, Prager J, Bevan H, Qiu Y, Fernandes ES, Gammons MV, Ballmer-Hofer K, Gittenberger de Groot AC, Churchill AJ, Harper SJ, Brain SD, Bates DO, Donaldson LF. Regulation of alternative VEGF-A mRNA splicing is a therapeutic target for analgesia. *Neurobiol Dis.* 2014 Nov; 71: 245-59.
62. Hulse RP. Role of VEGF-A in chronic pain. *Oncotarget.* 2017 Feb 14; 8(7): 10775–6.
63. Kiguchi N, Kobayashi Y, Kadowaki Y, Fukazawa Y, Saika F, Kishioka S. Vascular endothelial growth factor signaling in injured nerves underlies peripheral sensitization in neuropathic pain. *J Neurochem.* 2014 Apr; 129(1):169-78.
64. Kiguchi N, Kobayashi Y, Kadowaki Y, Fukazawa Y, Saika F, Kishioka S. Vascular endothelial growth factor signaling in injured nerves underlies peripheral sensitization in neuropathic pain. *J Neurochem.* 2014 Apr;129(1): 169-78;
65. Koodie L, Ramakrishnan S, Roy S. Morphine suppresses tumor angiogenesis through a HIF-1alpha/p38MAPK pathway. *Am J Pathol.* 2010 Aug; 177(2):984–97.
66. Yamamizu K, Furuta S, Katayama S, Narita M, Kuzumaki N, Imai S, Nagase H, Susuki T, Narita M, Yamashita JK. The kappa opioid system regulates endothelial cell differentiation and pathfinding in vascular development. *Blood.* 2011 Jul 21;118(3):775–85.
67. Yamamizu K, Furuta S, Hamada Y, Yamashita A, Kuzumaki N, Narita M, Doi K, Katayama S, Nagase H, Yamashita JK, Narita M. κ Opioids inhibit tumor angiogenesis by suppressing VEGF signaling. *Sci Rep.* 2013 Nov 14;3:3213.

F - ARTIGO CIENTÍFICO 2 (VERSÃO LÍNGUA INGLESA)

EFFECT OF ANTI-VEGF-A IN THE REGENERATION OF PERIPHERAL NERVE IN MODEL OF CRUSH INJURY

Authors: Rodrigues IK¹, Karvat J², Martins BBP², Lyra Jr. HF¹, D'Acampora JA⁴, Duarte ECW³, dos Santos ARS².

1. Department of Surgery, UFSC
2. Department of Physiology, UFSC
3. Department of Morphology, UFSC
4. Department of Surgery, UNISUL

ABSTRACT

Background: Falling lesions are frequent in oncological patients, and neuropathies secondary to chemotherapy and trauma are growing increase in this population. Although VEGF promotes effects on neurodevelopment and neuroprotection, the use of VEGF inhibitors is highlighting among antineoplastic agents.

Objective: To evaluate the effect of Bevacizumab (VEGF inhibitor) on the median nerve regeneration of *Wistar* rats submitted to crush injury.

Methods: A randomized, double blind study using 132 *Wistar* male rats, with a mean weight of 250-300g and age between 12 and 14 weeks, from the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Brazil. It was used the experimental model of injury by median nerve crush. Bevacizumab (BEV) application in 2 doses (10 and 20 mg / kg) were compared with operated controls and *shams* (NaCl 0.9% and BEV 20 mg / kg). Nerve regeneration was evaluated by: grasping test and histological parameters in nerve tissue. Statistical evaluation among the groups was obtained by 1-way and 2-way ANOVA, with either Dunnett or Tukey *post-test*, respectively, using the Prism 6.07™ program, GraphPad Software (La Jolla, CA, USA).

Results: There was no statistically significant difference in the grasping test; nerve diameters and myelinated axonal fibers; concentrations of VEGF among NaCl 0.9% and bevacizumab groups submitted to median nerve crush injury.

Conclusion: Bevacizumab does not lead to worsening of neurological function in animals submitted to nerve crush injury.

Keywords: VEGF; bevacizumab; peripheral nerve injury; crush injury; nerve regeneration.

1. BACKGROUNDS

Among the risk factors for falls in the oncological population, the use of chemotherapeutic agents ¹ stands out. In general, cancer patients show an increase

in the incidence of falls, which reaches about 50% in those with advanced malignancies. Participants who presented symptoms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) were 2.67 times more likely to report a fall or a near-fall event compared to participants without symptoms of CIPN². Among the lesions in this group, the limb fracture is highlighted, which in turn can lead to traumatic peripheral nerve injury (TPNI). In addition, data revealed that moderate to severe CIPN not only doubled the fall rate, but also worsened quality of life and functional independence in survivors of malignant neoplasms³.

Among the new treatments used in chemotherapy, there is a growing emphasis on bevacizumab⁴⁻¹⁵, a drug whose oncological action is based on the suppression of tumor growth by the inhibition of VEGF¹⁶⁻¹⁸. However recent studies have demonstrated the importance of VEGF as a fundamental growth factor in the process of neuronal growth and regeneration¹⁹⁻²¹. Thus, motivated by the clinical problem exposed, the aim of this work is evaluate the effect of VEGF-A recombinant humanized IgG1 monoclonal antibody (bevacizumab) on the functional and morphological parameters of neuroregeneration mechanisms, using the experimental model of median nerve crush injury in *Wistar* rats.

2. MATERIALS AND METHODS

* **Animals: Characteristics, Veterinary Conditions and Packaging and Ethics**

It was used one hundred twenty 3 months-old male *Wistar* rats, weighting approximately 250-300 grams from animal house of Federal University of Santa Catarina (UFSC), in Brazil. Rats were housed in large cages in a temperature and humidity controlled room, with a light-dark cycle of 12h and with *ad libitum* access to food and water. Adequate measures were taken to minimize animals pain and discomfort. The stages of the tests were performed at the Laboratory of Neurobiology of Pain and Inflammation (LANDI) located at UFSC. All experimental procedures were in accordance with UFSC Ethical Committee, that follows the recommended national and international guidelines for the use of animal models for experimentation.

* **Experimental Design**

Following the 3 R's principle, based on previous studies in our laboratory and after statistical calculations, the number of animals in each experimental group was established as being 6 for each group. The sample was divided into 5 groups of animals, named: sham with isotonic saline solution (sham NaCl 0.9%); *sham* with bevacizumab at 20 mg / kg (Sham BEV20); crush nerve surgery with isotonic saline solution (Op NaCl 0.9%); crush nerve surgery with bevacizumab at 10 mg / kg (Op BEV10); crush nerve surgery with bevacizumab at 20 mg / kg (Op BEV20). Each group was randomly distributed in 4 periods (3 days, 7 days, 14 days, 21 days), in which the functional response of the animals was evaluated (Figure 1).

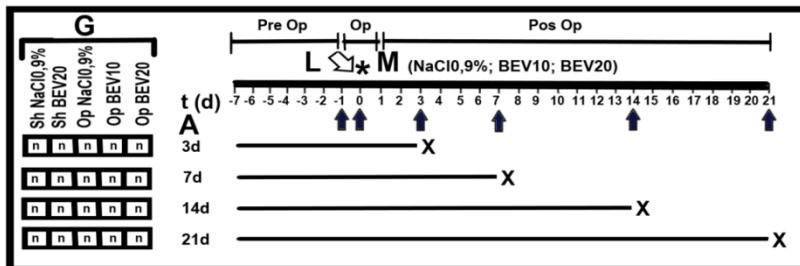


Figure 1: Flow diagram illustrating the main research design (G = groups, L = lesion, M = medicine; A = assays in key periods for the experiment; Hollow arrow = injury induction; Asterisk = infusion of medicine [NaCl 0.9% or BEV10 / 20 mg / kg]; Filled arrow = evaluation time; X = day of euthanasia; "n" houses = representative of the number of animals in each group; t = time; d = day)

For the functional study (grasping test), the animals were evaluated in a 4 period intervals (3 days, 7 days, 14 days and 21 days) (Figure 1). For the morphological study it was decided to compare the phase of acute inflammatory response (3 days) with a late inflammatory response (21 days), in which rats usually would have return their motor function^{22,23}.

Samples of Bevacizumab (Avastin™), F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, BS, Switzerland), a recombinant humanized IgG1 monoclonal antibody that binds to human vascular endothelial growth factor A, were donated in partnership with the Center for Oncology Research (CEPON), of State of Santa Catarina Health Secretary, at Brazil. Based on previous work by other authors^{22,24}, the animal crushing time was set at 30 seconds. The experiments and subsequent evaluations always happened in the morning (9 am to 12 a.m.) and the animals were weighed immediately before each surgical procedure, which was always performed by the same team. In the experimental laboratory (LANDI), the rodents underwent a pre-procedure adaptation period of 1 week. In order to minimize the effects of subjective bias in the process of choice of animals (for the study group or its control), a randomization process was carried out and, in order not to influence the result, the researchers who observed and collected the animals results of behavioral evaluation, and histopathological analysis were blinded in these phases.

* Experimental Procedure

For the surgery, the animals were deeply anesthetized *via* intramuscular injection of a solution composed of ketamine (50g / 100ml) and xylazine (2g / 100ml) in the proportion 1: 1, at the dose of 0.3 ml / 100 g body mass of rats.

After the anesthesia, an intraperitoneal injection of the medicine (NaCl 0.9% or BEV) was applied. Then, the skin of the right forelimb was opened in the longitudinal direction proximal to the elbow with a small incision with a scalpel. The muscle layers were separated with blunt dissection and the right median nerve was exposed and then crushed with a Mayo-Hegar needle-holder with tungsten tip, 14 cm, 5 1/2 ", Edlo™ / ITM SA Indústria de Tecnologias Médicas (Canoas, RS,

Brazil) applied 1 cm proximally to the bifurcation of brachial artery for 30 seconds. The locking was established in the 1st rack and a contact area of approximately 1 cm² was observed, which determined a pressure of 24.2 N / cm² which caused injury to the animal (Figure 2). This instrument was previously tested in the Laboratory of the Mechanical Analysis and Design Group (GRANTE), linked to the Department of Mechanical Engineering of UFSC. In *sham* animal groups this step was not performed. After that, the skin was closed with a 3.0 surgical suture of polyglactin 910 (Vicryl™), Ethicon-Johnson & Johnson do Brasil Ltda. (São Paulo, SP, Brazil). After the surgical procedure, the animals were reconditioned in their plastic cages. Once the recommended evaluation period for each group had been reached, the rodents were submitted to euthanasia following the rules established by the local Ethics Committee.

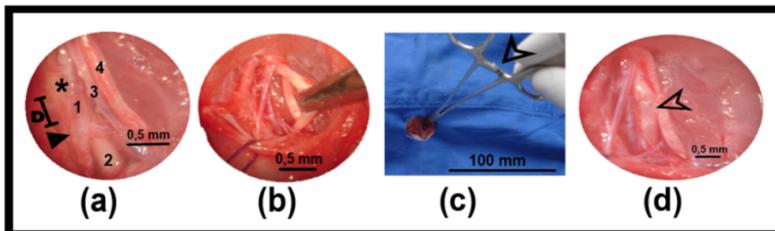


Figure 2: Procedure in the region of the cubital fossa of the animal: (a) Identification of the lesion site (D = distance from the lesion to the bifurcation of the brachial artery; Asterisk = site of the lesion; Filled arrow = bifurcation of the brachial artery; 1 = brachial artery; 2 = median nerve, 3 = brachial vein, 4 = ulnar nerve); (b) Crushing in the median nerve; (c) Model of nerve injury presenting needle holders, with indicative hollow arrow highlighting the locking in the 1st rack; (d) Appearance of the nerve after immediate crushing with an hollow arrow indicative of the lesion site. (a, b, d = vision of the surgical microscope, magnification 25x; c = macroscopic vision).

* Functional Response Measurement Test

For the behavioral evaluation of the return of the flexor-pronator activity of the forelimb that suffered injury to the median nerve was used the grasping test.

It was performed using a digital dynamometer, model DD 500™, Instrutherm Instrumentos de Medição Ltda (São Paulo, SP, Brazil). Each animal was tested 5 times and the mean value was then recorded. Force assessments/evaluations occurred on days 3, 7, 14, and 21 after nerve injury.

* Histopathological Evaluation

After the determined period of evaluations for each group, the material (median nerve) was collected. Thus, in the recommended protocol, the fixation was carried out in 10% formaldehyde solution for 24h. It was followed by 3 times washing sequences and then inclusion was performed with increasing dehydration in ethyl alcohol (70%, 80%, 90% and 100%). Afterwards, diaphanization was carried out in xylol and impregnation in paraffin with the confection of the blocks. The 5 µm

sections were then performed using the rotary microtome, RM 2125RT™, Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nußloch, BW, Germany). It was finished with the hematoxylin-eosin (HE) staining and subsequent analysis of the slides under a light microscope.

Then the images were captured using an Olympus BX41 ® Microscope, Olympus Corporation (Shinjuku, Tokyo, Japan) (Figure 3). The Image Capture System consisted of a color digital camera of 3.3 Mpixels and the Q-capture Pro 5.1™ image capture program, Q-imaging (Surrey, BC, Canada). For this, at a magnification of 400x the nerve area was divided into quadrants (Figure 3). In each fourth part of the circle an area of $500 \mu\text{m}^2$ was delimited (Figure 3). In these specified regions, 20 nerve fibers were randomly selected, totaling 80 fibers per nerve. All steps described were performed in Histology and Pathology laboratories, at UFSC.

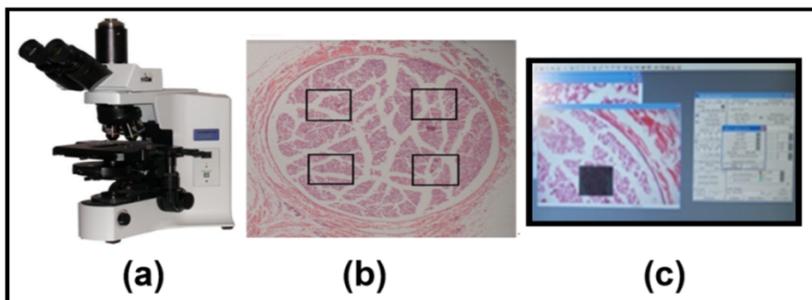


Figure 3: Histopathological evaluation: (a) Illustrative image of the microscope used for image capture; (b) Representation of the $500 \mu\text{m}^2$ areas in each quadrant of the nerve; (c) Area of $500 \mu\text{m}^2$ visualized with the capture software used.

Subsequently, the analysis of the slides was performed and research was blinded in relation to the study design. Hematoxylin-eosin stained slides (HE) were evaluated in magnifications of 100 and 400x using the Image J program, National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA).

The quantitative characteristics measured were: nerve diameter (D); diameter of the fibers in the nerves (d); ratio nerve diameter / fiber diameter (D / n). Simultaneously, a qualitative evaluation was performed, which verified aspects such as: Alterations in the architecture of the nerve such as discontinuity of perineuro or presence of fibrosis in the nerve and modifications in the fascicular organization; presence of inflammatory cells; loss of large myelin axons.

*** Statistical methods**

For the statistical analysis of the results, the Prism 6.07™ program, GraphPad Software (La Jolla, CA, USA) was used. The normality of the data was evaluated by Shapiro Wilk test.

In the functional parameters, 2-way ANOVA with Repeated Measurements and Dunnet's post hoc test were used. Already for the intragroup data inference, 2-way

ANOVA was performed with Tukey post hoc analysis. Morphometric data were interpreted by 1-way ANOVA with Tukey post hoc test.

3. RESULTS

4.1 – FUNCTIONAL: GRASPING TEST

During a period of 21 days, the inter-group comparison of strength values was performed: sham with isotonic saline solution (*sham* NaCl 0.9%); sham with bevacizumab 20 mg / kg (*sham* BEV20) drug solution; surgery for nerve crushing with isotonic saline solution (Op NaCl 0.9%); surgery for nerve crushing with drug solution bevacizumab at 10 mg / kg (Op BEV10); surgery for nerve crushing with bevacizumab drug solution at 20 mg / kg (Op BEV20).

For that, 2-way ANOVA with Repeated Measurements and post hoc analysis were performed using the Tukey test. The interaction [F (DFn, DFd)] found was F (16, 100) = 12.18; $p < 0.0001$ and the data were expressed by Mean and Standard Error of the Means (SEM).

The Figure 4 represents the evolutionary relationship of force over time between groups. It was observed that there was no difference between the subgroups in the basal period, ensuring the homogeneity of the sample. It was also found that there was no difference between the shams groups (NaCl 0.9% and BEV20) during the whole period evaluated. When evaluating periods 3, 7 and 14 days, a significant difference was found in the findings ($p < 0.0001$) of the 3 groups operated in relation to sham with saline solution (NaCl 0.9%) or sham BEV20. The phenomenon ceased to exist on the 21st day, when all of them no longer showed significant difference with sham groups, in response to strength recovery in all operated groups. It is also worth noting that during the whole period no statistical difference was observed when comparing the subgroups operated with each other.

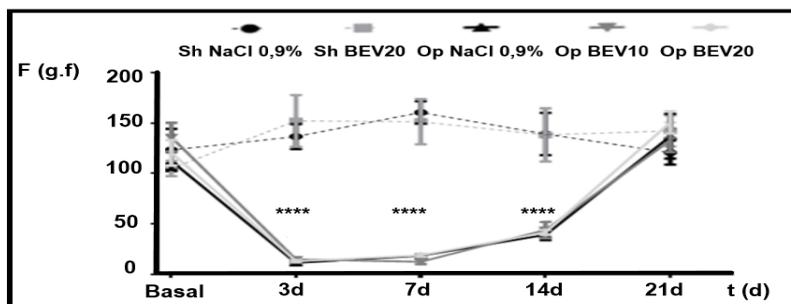


Figure 4: Temporal evaluation of the intergroup force by grasping test, in which Sham groups were related to Operated groups. Values expressed in Mean \pm SEM. (F = force, t = time, g.f = gram-force, d = Day; Sh NaCl 0.9% = sham group with isotonic saline; Sh BEV20 = sham group with bevacizumab 20 mg / kg; Op NaCl 0.9% = group operated with isotonic saline; Op BEV 10 = group operated with bevacizumab 10 mg / kg; Op BEV 20 = group operated with bevacizumab 20 mg / kg; **** $p < 0.0001$; SEM = Standard Error of the Means).

Thereafter, the detailed comparison of each group (intragroups) was performed over time: Sham NaCl 0.9%; Sham BEV 20; Operated NaCl 0.9%; Operated BEV10; Operated BEV20, during the 21 day period, always comparing with the baseline period of each group.

For this purpose, 2-way ANOVA with Repeated Measures and post hoc analysis were used using Dunnett's multiple comparison test. The interaction [F (DFn, DFd)] found was $F(16, 100) = 12.18$; $p < 0.0001$. The data were expressed by Mean and Standard Error of the Means (SEM).

It was shown that there was no difference in sham groups (NaCl 0.9% and BEV20) over time. However, in all operated groups (with or without drug application) an inflection occurred in the values of the force, which decay until the 14th day in an expressive manner and statistically significant, when compared to their respective basal values. This phenomenon ceased to exist in the subsequent week, at 21 days of evaluation, with return to values of the original patterns. At this time, in all operated groups, the results obtained were not significant when compared to their baseline values.

4.2 – MORPHOLOGY: HISTOMORPHOMETRIC AND QUALITATIVE ANALYSIS

The evaluation of the morphological patterns was followed in 2 moments of regeneration, in the 3rd and 21st days and involved 2 analyzes: quantitative and qualitative.

For the histomorphometric intergroup evaluation, 1-way ANOVA with Repeated Measurements and subsequent *post hoc* Tukey test.

Initially, the median nerve diameter was studied in the different groups. The interaction [F (DFn, DFd)] found was $F(9, 17) = 0.7470$; $p = 0.6635$. The data were expressed by Mean and Standard Deviation (SD). It can be observed that all post-trauma groups showed an increase in their thickness when compared to the control groups (*sham*) in the 2 time intervals evaluated (3 and 21 days). In the 3-day period, those animals whose VEGF inhibition was greater after the trauma (Op BEV20) showed a tendency to develop a larger diameter in relation to the other groups in this specific period (Table 1). It is interesting to note that, in the third week (21 days), this morphological pattern to which there is a larger diameter of the groups submitted to crushing in relation to the sham was also maintained. However, it should be noted that all these results in which there were differences between the means of the groups (in the 2 periods described) were not statistically significant.

Likewise, inference of fiber diameter in the various groups also demonstrated that the differences among their means (in the 2 time slots described) were not statistically significant. The interaction [F (DFn, DFd)] found was $F(9, 21) = 1.515$; $p = 0.2067$ were expressed by Mean and Standard Deviation (SD). Another important finding was that on the 21st day the values of the diameters of the operated groups obtained results that were close to each other, but curiously of a smaller thickness when confronted with the sham groups (Table 1). On the other hand, the D / d

ratio did not show a relationship between the different groups or even statistical significance on the same day or between the different days.

Table 1: Comparison of histomorphometric parameters among groups on days 3 and 21. Values expressed in Mean \pm SD (when indicated).

(mm = millimeter; μm = micrometer; Sh NaCl 0.9% = sham group with isotonic saline; Sh BEV20 = sham group with bevacizumab 20 mg / kg; Op NaCl 0.9% = group operated with isotonic saline; Op BEV 10 = group operated with bevacizumab 10 mg / kg; Op BEV 20 = group operated with bevacizumab 20 mg / kg; D = median nerve diameter; d = mean diameter of the myelinated fibers of the median nerve; D / d = ratio between nerve diameter and fiber diameter; SD = standard deviation).

GROUPS/DAYS		3 DAYS (Mean \pm SD)	21 DAYS (Mean \pm SD)
Sh NaCl 0,9%	D	0,1884 \pm 0,0014 mm	0,1862 \pm 0,0017 mm
	d	5,9199 \pm 0,5882 μm	6,307171 \pm 0,4813 μm
	D/d	31,82486	29,5219
Sh BEV 20	D	0,1882 \pm 0,0898 mm	0,1854 \pm 0,0077 mm
	d	6,7125 \pm 1,0453 μm	6,665475 \pm 0,7476 μm
	D/d	28,03724	27,8150
Op NaCl 0,9%	D	0,2288 \pm 0,1238 mm	0,2441 \pm 0,0446 mm
	d	7,5532 \pm 0,3979 μm	5,545663 \pm 1,3231 μm
	D/d	30,29179	44,0164
Op BEV 10	D	0,2708 \pm 0,0832 mm	0,2389 \pm 0,0303 mm
	d	7,2918 \pm 1,5641 μm	5,845302 \pm 1,1369 μm
	D/d	37,13760	40,8704
Op BEV 20	D	0,2942 \pm 0,1256 mm	0,2531 \pm 0,0593 mm
	d	5,9300 \pm 0,9705 μm	5,345295 \pm 0,9853 μm
	D/d	49,61214	47,35

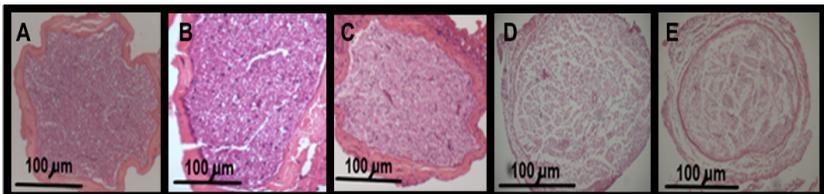
Regarding the qualitative analysis, it was observed in the period of 3 days (Figure 5) that the *sham* groups did not present morphological alterations characterized by alteration of the fascicular organization, increase in the number of inflammatory cells or loss of myelin fibers. The drug also produced no modification of the nerve architecture in these 2 groups. In the Operated NaCl 0.9% group, however, irregularity and thickening of the perineurium occurred, associated with moderate inflammatory infiltrate. It was also possible to notice a loss of the axonal architecture translated by the axonal dysmorphism and disorganization of the structures associated to the loss of larger myelin axons. In the Operated Bevacizumab group 10 mg / kg, epineurium thickening was identified, with neovasal and mild inflammatory infiltrate. The nerve also showed loss of the major myelin axons and presentation of atypical axonal morphological figures as well as loss of the fascicular group. Finally, in the Operated Bevacizumab 20 mg / kg group, there was a loss of the population of larger myelin axons and presentation of atypical axonal morphological figures, associated with a moderate perineural inflammatory infiltrate, thin walled vessels, proximal; as well as thickening of the perineurium and loss of the fascicular pattern.

When examining the 21-day period (Figure 6), it was noted, in a manner similar to that found in that of 3 days, that *sham* groups did not develop structural alterations. On the other hand, the NaCl 0.9% group was characterized by a loss of

perineurium in about 15% of the circumference, on average, where it was found a more dense collagen tissue invading the endoneurium associated with a moderate epineurial inflammatory infiltrate. It was also observed the loss of the fascicular architecture, with disorganization of the axons, which were surrounded by cicatricial collagen fiber. A decrease in the number of large myelin axons was also visualized. In the bevacizumab group 10 mg / kg, the loss of the nerve structure with destruction of the perineurium was observed in about 30% of the circumference, on average. Loss of fascicular structure with disorganization and reduction of the population of axons of greater caliber associated with the presence of inflammatory cells was also observed. Finally, in the bevacizumab 20 mg / kg group, a significant thickening of the epineurium was identified, with increased collagen and neovasal formation. There was also a remarkable loss of fascicular architecture, disorganization of the axons, which were surrounded by cicatricial collagen fiber and presence of marked reduction of the larger myelin axons.

MORPHOLOGY: 3 DAYS

100X



400X

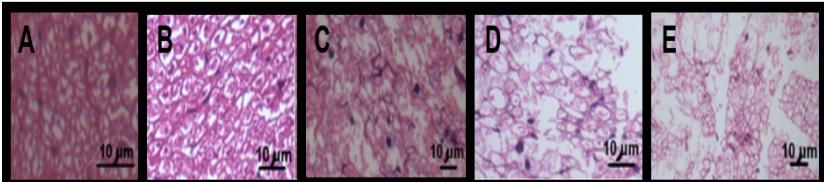
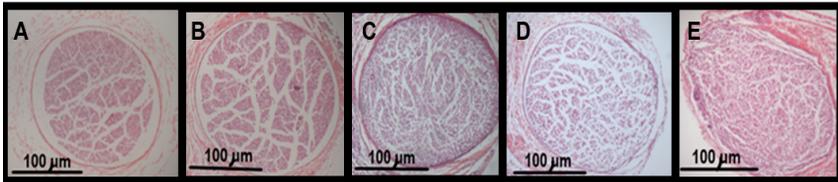


Figure 5: Median nerve cross-section of rats submitted to crushing after 3 days: (A) Sham NaCl 0.9%; (B) Sham Bevacizumab 20 mg/kg; (C) Operated NaCl 0.9%; (D) Operated Bevacizumab 10 mg/kg; (E) Operated Bevacizumab 20 mg/kg (HE staining: 100x; 400x; μm = micrometer).

MORPHOLOGY: 21 DAYS

100x



400x

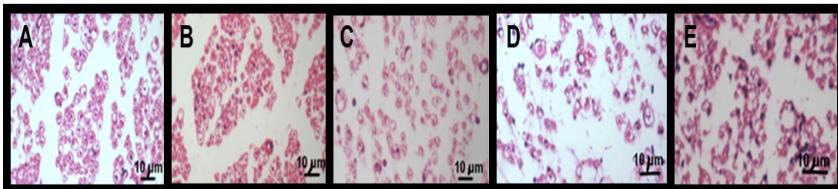


Figure 6: Median nerve cross-section of rats submitted to crushing after 21 days: (A) Sham NaCl 0.9%; (B) Sham Bevacizumab 20 mg/kg; (C) Operated NaCl 0.9%; (D) Operated Bevacizumab 10 mg/kg; (E) Operated Bevacizumab 20 mg/kg (HE staining: 100x; 400x; μm = micrometer).

4. DISCUSSION

It was verified that the obtained functional results would present reliability. The guarantee of sample homogeneity was evidenced by the demonstration that there was no difference in force expression between all groups at baseline (pre-injury). Similarly, during the whole experiment, we tried to ensure the transparency and reproducibility²⁵⁻²⁶ of the experiments and, for this, the guidelines recommended by ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) and STAR method, which are followed by researchers who carry out experimental studies worldwide²⁷⁻²⁹.

In this sense, it is important to note that there was no difference between the *sham* groups (NaCl 0.9% and BEV20 mg / kg) over time (Figure 4). This reflects that the drug would not worsen strength if the structure and physiological mechanisms of the nerve were preserved. However, there are papers showing controversial results in the role of the VEGF inhibitor. A recent publication emphasizes that bevacizumab would not increase markedly the toxicity when used in combination with a variety of chemotherapeutic agents³⁰. Likewise, a preclinical experimental work revealed an improvement in pain behavior symptoms due to oxaplatin neuropathy with VEGF-A modulation³¹. On the other hand, a clinical cohort study observed that this agent would exacerbate paclitaxel-induced neuropathy³². Our findings in the experimental model did not reveal worsening of the functional parameters in animals that used VEGF inhibitor. At least when the strength is

assessed, the drug appears to have been shown to be safe, with no functional motor repercussions when used alone in rodents.

Interestingly, when the animals are exposed to a situation of tissue destruction and loss of homeostasis mechanisms, such as nerve trauma, the drug at different doses (BEV 10 or 20 mg / kg) also did not cause worsening or delay of the functional parameter, when confronted with animals using NaCl 0.9% submitted to the same lesion model (Figure 4). Thus, due to tissue trauma, the present study revealed that in all operated groups (with or without drug application), there was loss of motor functional capacity. This phenomenon was demonstrated by a significant decay in the force values up to the 14th day, with statistically significant results when compared to their respective baseline values. This event didn't happen in the subsequent week, when the return to basal patterns is observed, reflecting the recovery of the force of all groups of animals that suffered tissue trauma. This finding particularly demonstrates that the drug did not promote delay in the return of the motor function, independently of the dose used in the animals. This result can be compared with work data using a median nerve crush lesion model without anti-VEGF, which revealed that the functional recovery would already be detectable at day 12 and progressively increased until the 28th day, after which the animal performance would reach a plateau until the end of the test (at day 42), reaching about 75-80% of the preoperative values²².

When the functional results are compared to the morphological findings, it is possible to observe a convergence of the VEGF inhibitor responses to the trauma in the different groups, which promoted greater robustness to the impact of the findings. Particularly on the histological analysis, it was decided to evaluate the morphological patterns in 2 fundamental moments of the regenerative response of the animal. Thus, the choice of the third day for histological analysis stems from the fact that the drug presents a half - life time of approximately 8 days in rats³³, with a peak of action between 1 and 3 days, associated with the fact that the sprouting phenomenon (regenerative mechanism of crushing injury) was started in the first four days after damage³⁴. The second time line was chosen because the functional return manifested during the end of the second and beginning of the third week in the medial nerve crush model²². In addition, in the rat, the time course of the event of removal of myelin and axon residues by means of phagocytosis lasts on average 3 weeks²³.

In this way, we re-emphasize the absence of findings in the sham group BEV 20, both in the period of 3 and in that of 21 days, ratifying the results of the functional data in which the drug had no effect when the morphophysiological state was preserved (Table 1). In the post-trauma groups, it was observed that the nerves presented an increase in their thickness compared to the control groups (sham) in the 2 times intervals evaluated (3 and 21 days), and especially on the third day these differences of dimensions became more evident (Table 1). Particularly in this first course of time this event may probably be attributed to the edema resulting from the inflammatory process following tissue injury. The peripheral nerve lesion would therefore change the permeability of the physical barriers in the peripheral nerves, causing a change in the local microenvironment. Because there is no

lymphatic system in the endoneural space, elevated permeability and unbalanced pressure can easily induce edema in the nerve structure³⁵. It is interesting to note that in the third week this morphological pattern (larger diameter of the groups submitted to crushing in relation to sham) is maintained, although functionally in this period the animals already show a return of their pre-sessile function of the thoracic limb, as shown previously.

When analyzing the diameters of the nerve fibers, it was observed on the 3rd day that the nerve fiber dimensions of the operated groups were higher in relation to the sham groups (Table 1). We attribute this event again to the edema that follows after the trauma, since studies evidence significantly increased endoneural fluid pressure within 90 minutes after sciatic nerve crush in rodents, where a five-fold peak level on the tenth day and remained at a high level until day 16, when it then declined to baseline³⁵. However, on the 21st day (when the action of the drug would have ceased to function), the fiber diameters of the operated groups presented close values among themselves, but fundamentally their dimensions were markedly smaller when compared to *sham* groups (Table 1). This finding observed in this period could possibly be attributed to the reduction of the myelin thickness that follows after the mechanism of trauma²⁴. Thus, these results of histomorphometric parameter evaluation correspond to the known fact that nerve fibers can not return to preoperative size even after very long recovery times²⁴.

When the qualitative morphological aspects are observed in the 3 and 21 day plots (Figures 5 and 6), a particularly important finding is the absence of polymorphonuclear cells in all groups evaluated, both in the 3-day and 21-day animals. However, the presence of inflammatory mononuclear cells in the two periods is observed, particularly in the groups that suffered the traumatic injury. This is due to the fact that neutrophil recruitment occurs early after nerve damage whereas macrophage infiltration starts from 2 to 3 days with peak at 7 days post-injury³⁶. It is important to note that myelin and axonal debris are phagocytosed in the early days by the Schwann cells themselves which have this role subsequently replaced by macrophages entering through the blood-nerve barrier (BNB) that became permeable after the trauma and then carry out most of this process. In the rat, the time course of these events is a period lasting at least three weeks in which myelin and axon residues are slowly removed, after which the macrophages leave the lesion site²³. In this way, macrophages play a fundamental role in nerve regeneration and together with the Schwann cells they orchestrate this regenerative process³⁷⁻³⁹.

VEGF is also known to regulate the new growth of axons in damaged peripheral nerves to aid in the recovery of sensory and motor functions after injury. In this new microenvironment of the nerve, macrophages migrate into the axonal space, which is now devoid of axons, and begin to secrete VEGF to induce the formation of new blood vessels. Schwann cells use these vessels as trails to migrate into the axonal space and thereby facilitate new axonal growth. Consequently, the exogenous distribution of VEGF in injured nerves further increases axon regeneration. In this way, VEGF would extend neuronal regeneration after injury indirectly, through mechanisms dependent on blood vessels and possibly also

directly⁴⁰. However, as can be observed, the findings revealed in our study were not reflected in the negative repercussion of the functional aspects with the inhibition of VEGF in different doses.

The morphological results of all groups operated over the 3-day period reproduce the state following the trauma of nerve tissue in which there is a reduction in motor functional capacity, particularly since a loss of the population of large-caliber myelin axons (Fibers A α), which are responsible for the efferent motorways³⁴. The presence of inflammatory cells and the disorganization of the fascicular organization, as well as the compromise of the nerve architecture, due to the discontinuation of epineurium to varying degrees, also express the damage promoted by the traumatic lesion and that repercussion in the grip test in this period of 3 days (Figure 5). Particularly on the 21st day, a curious phenomenon was the dichotomy of the functional and morphological findings in this period, since although all groups of animals already presented a return of the pre-sessile activity of the thoracic limb after the damage, the same did not occur in the findings morphological changes, which still show signs of injury and tissue repair (Figure 6). In the latter period, the presence of scarred collagen fiber was also noted in the operated groups, which in the case of the model used (crushing) did not significantly affect functional recovery (Figure 6). The demonstration of a mismatch in the restructuring of nerve architecture in comparison with its functionality is also described in other works such as by Ronchi et al., who evaluated animals at 42 days after nerve injury²² and Muratori et al. studied rodents in the 8 and 24 week intervals²⁴ in models of medial nerve crushing, but without the use of the VEGF inhibitor.

Mainly, this last author worked with a longer time line, which showed a fast functional recovery, in up to 4 weeks, whereas morphological regeneration predictors (axon diameter, fiber diameter, myelin thickness and g ratio) had not yet returned to normal values after 24 weeks, except for the total number of fibers²⁴. However, one aspect to be highlighted is that the regenerative process in axonotmese model, adopted in our research, as well as in these studies, involves the budding phenomenon³⁴, a fact that can overestimate the amount of fibers. Thus, although the enumeration and histomorphological analysis of regenerated axons can generate much data and are therefore more commonly used as outcome measures, they must be analyzed with discretion. This is because the emergence of multiple sprouts of axons from each of the crushed or transected nerves in the proximal stump is an important issue and is often ignored. An average of about 5 regenerated axons are emitted from the proximal nerve stump after a crush injury²³. A further complicating problem is that each sensory neuron generates twice as many axon branches (approximately 6) as the motoneurons (around 3)²³. This emission of multiple axons from the proximal stump of an injured nerve can in fact lead to erroneous conclusions when only axon counts are made to evaluate axon regeneration²³. The qualitative analysis, which complements and guides the morphometric evaluation, is highlighted. It should also be remembered that other aspects that not only histomorphometric patterns would be involved in the functional return. Thus, other factors could affect the quality of the transmission

and consequent return of function, such as the presence of scar tissue evidenced by studies in both the SNP and CNS⁴¹⁻⁴², that in our study did not bring difference between the different groups.

Nevertheless, the return of motor function of the injured limb, even with the inhibition of VEGF, could be explained or justified by the ingenious machinery of regeneration of the peripheral nerve that also involves some other important trophic factors, among them nerve growth factor (NGF); brain derived neurotrophic factor (BDNF); ciliary neurotrophic factor (CNTF); glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF); neurotrophin 4 (NT4); platelet - derived growth factor (PDGF), among others⁴³⁻⁴⁴ that perform important actions on nerve regeneration. The latter, like VEGF, demonstrate the perfect symbiosis between the vascular and nervous systems in this regenerative process.

Our work presents limitations and factors that complicate the translation of the results obtained in this study with rodents for application in clinical practice. Among these, we emphasize that the regeneration rate of the axon may be slower in humans than in rodents³⁷. However, the greatest of these is the non-use of Electronic Microscopy (EM) for morphological evaluation, which restricts the visualization of certain structures, particularly the unmyelinated fibers. As the objective of this study was to evaluate the motor response following the trauma, this restriction can be compensated, since the somatomotor efferent fibers are, in their entirety, composed of large-caliber myelin fibers type A⁴⁵. Let us also remember that the model of regeneration involved in this study is essentially collateral sprouting³⁴. Therefore, the precise quantification of the fibers could also be impaired in this visualization method.

Essentially this study found that the systemic use of VEGF-A antibody in animals that do not have established nerve damage did not lead to a worsening of the force. Similarly, inhibition of VEGF-A by bevacizumab in a peripheral nerve injury model did not translate into delay or worsening of functional recovery at different doses. This data is particularly relevant because in axotomy and chronic muscle denervation, reduced or inadequate neurotrophic factors in Schwann cells or target organs over time may lead to more unfavorable functional outcome⁴³. In light of this fact, to the best of our knowledge, there were no data in the literature reporting whether or not, with the use of the VEGF-A inhibitor, there would be delay in the reinnervation of the target organ after nerve trauma.

As demonstrated, CIPN is a relatively common and serious consequence of cancer treatment, and is often the main reason for the reduction or discontinuation of therapy⁴⁶. Because bevacizumab does not result in worsening of the functional, morphological or biochemical aspects in this experimental model, these results may in future bring great impacts in clinical studies regarding the treatment of neoplasms.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

5. CONCLUSIONS

The anti-VEGF-A antibody (bevacizumab) does not lead to worsening of functional or morphological in a median nerve crush injury model in Wistar rats.

REFERENCES

1. Wildes TM, Dua P, Fowler SA, Miller JP, Carpenter CR, Avidan MS, Stark S. Systematic review of falls in older adults with cancer. *J Geriatr Oncol*. 2015 Jan;6(1):70-83.
2. Kolb NA, Smith AG, Singleton JR, Beck SL, Stoddard GJ, Brown S, Mooney K. The Association of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy Symptoms and the Risk of Falling. *JAMA Neurol*. 2016 Jul 1;73(7):860-6.
3. Bao T, Basal C, Seluzicki C, Li SQ, Seidman AD, Mao JJ. Long-term chemotherapy-induced peripheral neuropathy among breast cancer survivors: prevalence, risk factors, and fall risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Sep;159(2):327-33.
4. Wakelee HA; Dahlberg SE; Keller SM; Tester WJ; GandaraDR; Graziano SL. Adjuvant chemotherapy with or without bevacizumab in patients with resected non-small-cell lung cancer (E1505): an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Dec; 18(12):1610-1623.
5. Han S, Hong Y, Liu T, Wu N, Ye Z. The efficacy and safety of paclitaxel and carboplatin with versus without bevacizumab in patients with non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Dec 23;9(18):14619-14629.
6. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, Cortesi E, Tomasello G, Ronzoni M, Spadi R, Zaniboni A, Tonini G, Buonadonna A, Amoroso D, Chiara S, Carlomagno C, Boni C, Allegrini G, Boni L, Falcone A. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2014 Oct 23;371(17):1609-18.
7. Tomasello G, Petrelli F, Ghidini M, Russo A, Passalacqua R, Barni S. FOLFOXIRI Plus Bevacizumab as Conversion Therapy for Patients With Initially Unresectable Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis. *JAMA Oncol*. 2017 Jul 13;3(7):e170278.
8. Kuboki Y, Nishina T, Shinozaki E, Yamazaki K, Shitara K, Okamoto W, Kajiwara T, Matsumoto T, Tsushima T, Mochizuki N, Nomura S, Doi T, Sato A, Ohtsu A, Yoshino T. TAS-102 plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies (C-TASK FORCE): an investigator-initiated, open-label, single-arm, multicentre, phase 1/2 study. *Lancet Oncol*. 2017 Sep;18(9):1172-1181.
9. Wallin JJ, Bendell JC, Funke R, Sznol M, Korski K, Jones S, Hernandez G, Mier J, He X, Hodi FS, Denker M, Leveque V, Cañamero M, Babitski G, Koeppen H, Ziai J, Sharma N, Gaire F, Chen DS, Waterkamp D, Hegde PS, McDermott DF. Atezolizumab in combination with bevacizumab enhances antigen-specific T-cell migration in metastatic renal cell carcinoma. *Nat Commun*. 2016 Aug 30;7:12624.

10. Gao X, Zhao Y, Stemmer-Rachamimov AO, Liu H, Huang P, Chin S, Selig MK, Plotkin SR, Jain RK, Xu L. SR, Jain RK, Xu L. Anti-VEGF treatment improves neurological function and augments radiation response in NF2 schwannoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 24;112(47):14676-81.
11. Zielinski C, Lång I, Inbar M, Kahán Z, Greil R, Beslija S, Stemmer SM, Zvirbule Z, Steger GG, Melichar B, Pienkowski T, Sirbu D, Petruzelka L, Eniu A, Nisenbaum B, Dank M, Anghel R, Messinger D, Brodowicz T; TURANDOT investigators. Bevacizumab plus capecitabine as first-line treatment for HER2-negative metastatic breast cancer (TURANDOT): primary endpoint results of a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Sep;17(9):1230-9.
12. Trédan O, Follana P, Moullet I, Cropet C, Trager-Maury S, Dauba J, Lavau-Denes S, Diéras V, Béal-Ardissou D, Gouttebel M, Orfeuvre H, Stefani L, Jouannaud C, Bürki F, Petit T, Guardiola E, Becuwe C, Blot E, Pujade-Lauraine E, Bachelot T. A phase III trial of exemestane plus bevacizumab maintenance therapy in patients with metastatic breast cancer after first-line taxane and bevacizumab: a GINECO group study. *Ann Oncol*. 2016 Jun;27(6):1020-9.
13. Kim MM, Umemura Y, Leung D. Bevacizumab and Glioblastoma: Past, Present, and Future Directions. *Cancer J*. 2018 Jul/Aug;24(4):180-186.
14. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, Brandes AA, Taal W, Domont J, Idbaih A, Campone M, Clement PM, Stupp R, Fabbro M, Le Rhun E, Dubois F, Weller M, von Deimling A, Golfopoulos V, Bromberg JC, Platten M, Klein M, van den Bent MJ. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2017 Nov 16;377(20):1954-1963.
15. Van Gompel JJ, Agazzi S, Carlson ML, Adewumi DA, Hadjipanayis CG, Uhm JH, Olson JJ. Congress of Neurological Surgeons Systematic Review and Evidence-Based Guidelines on Emerging Therapies for the Treatment of Patients With Vestibular Schwannomas. *Neurosurgery*. 2018 Feb 1;82(2):E52-E54.
16. Markus R, Chow V, Pan Z, Hanes V. A phase I, randomized, single-dose study evaluating the pharmacokinetic equivalence of biosimilar ABP 215 and bevacizumab in healthy adult men. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017 Oct;80(4):755-763.
17. Knight B, Rassam D, Liao S, Ewesuedo R. A phase I pharmacokinetics study comparing PF-06439535 (a potential biosimilar) with bevacizumab in healthy male volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016 Apr;77(4):839-46.
18. Sousa F, Cruz A, Fonte P, Pinto IM Neves-Petersen MT, Sarmento B. A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. *Sci Rep*. 2017 Jun 16;7(1):3736.
19. Stanojlovic M, Pang X, Lin Y, Stone S, Cvetanovic M, Lin W. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Exacerbates Loss of Lower Motor Neurons and Axons during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One*. 2016 Jul 28;11(7):e0160158.
20. Acosta L, Morcuende S, Silva-Hucha S, Pastor AM, de la Cruz RR. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Prevents the Downregulation of the Cholinergic Phenotype in Axotomized Motoneurons of the Adult Rat. *Front Mol Neurosci*. 2018 Jul 12;11:241.

21. Tovar-Y-Romo LB, Ramírez-Jarquín UN, Lazo-Gómez R, Tapia R. Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy. *Front Cell Neurosci*. 2014 Feb 28; 8:61.
22. Ronchi G, Nicolino S, Raimondo S, Tos P, Battiston B, Papalia I, Varejão AS, Giacobini-Robecchi MG, Perroteau I, Geuna S. Functional and morphological assessment of a standardized crush injury of the rat median nerve. *J Neurosci Methods*. 2009 Apr 30;179(1):51-7.
23. Gordon T, Borschel GH. The use of the rat as a model for studying peripheral nerve regeneration and sprouting after complete and partial nerve injuries. *Exp Neurol*. 2017 Jan;287(Pt 3):331-347.
24. Muratori L, Ronchi G, Raimondo S, Giacobini-Robecchi MG, Fornaro M., Geuna S. Can regenerated nerve fibers return to normal size? A long-term post-traumatic study of the rat median nerve crush injury model. *Microsurgery*. 2012 Jul;32(5):383-7.
25. Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature*. 2016 May 26;533(7604):452-454.
26. Steinfath M, Vogl S, Violet N, Schwarz F, Mielke H, Selhorst T, Greiner M, Schönfelder G. Simple changes of individual studies can improve the reproducibility of the biomedical scientific process as a whole. *PLoS One*. 2018 Sep 12;13(9):e0202762.
27. Reichlin TS, Vogt L, Würbel H. The Researchers' View of Scientific Rigor-Survey on the Conduct and Reporting of In Vivo Research. *PLoS One*. 2016 Dec 2;11(12):e0165999.
28. Glasziou P, Altman DG, Bossuyt P, Boutron I, Clarke M, Julious S, Michie S, Moher D, Wager E. Reducing waste from incomplete or unusable reports of biomedical research. *Lancet*. 2014 Jan 18;383(9913):267-76.
29. Marcus E; whole Cell team. A STAR Is Born. *Cell*. 2016 Aug 25;166(5):1059-1060.
30. Ferrara, N. & Adamis, A. P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2016;15: 385-403.
31. Di Cesare Mannelli L, Tenci B, Micheli L, Vona A, Corti F, Zanardelli M, Lapucci A, Clemente AM, Failli P, Ghelardini C. Adipose-derived stem cells decrease pain in a rat model of oxaliplatin-induced neuropathy: Role of VEGF-A modulation. *Neuropharmacology*. 2018 Mar 15;131:166-175.
32. Matsuoka A, Maeda O, Mizutani T, Nakano Y, Tsunoda N, Kikumori T, Goto H, Ando Y. Bevacizumab Exacerbates Paclitaxel-Induced Neuropathy: A Retrospective Cohort Study. *PLoS One*. 2016 Dec 19;11(12):e0168707.
33. Zhao YY, Wang N, Liu WH, Tao WJ, Liu LL, Shen ZD. Charge Variants of an Avastin Biosimilar Isolation, Characterization, In Vitro Properties and Pharmacokinetics in Rat. *PLoS One*. 2016 Mar 17;11(3):e0151874.
34. Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin*. 2013 Aug;29(3):317-30.
35. Liu Q, Wang X, Yi S. Pathophysiological Changes of Physical Barriers of Peripheral Nerves After Injury. *Front Neurosci*. 2018 Aug 23;12:597.

36. Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol.* 2015 Nov;130(5):605-18.
37. Scheib J, Höke A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol.* 2013 Dec;9(12):668-76.
38. Cattin AL, Lloyd AC. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2016 Aug;39:38-46.
39. Wood MD, Mackinnon SE. Pathways regulating modality-specific axonal regeneration in peripheral nerve. *Exp Neurol.* 2015 Mar;265:171-5.
40. Lange C, Storkebaum E, Almodóvar CR, Dewerchin M, Carmeliet P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nat Rev Neurol.* 2016 Aug; 12 (8):439-54.
41. Zhu D, Tapadia MD, MD, Palispis W, Luu M, Wang W, Gupta R. Attenuation of Robust Glial Scar Formation Facilitates Functional Recovery in Animal Models of Chronic Nerve Compression Injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2017 Dec 20;99(24):e132.
42. Ohtake Y, Li S. Molecular mechanisms of scar-sourced axon growth inhibitors. *Brain Res.* 2015 September 4; 1619: 22–35.
43. Jones S, Eisenberg HM, Jia X. Advances and Future Applications of Augmented Peripheral Nerve Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 7;17(9). pii: E1494.
44. Palispis WA, Gupta R. Surgical repair in humans after traumatic nerve injury provides limited functional neural regeneration in adults. *Exp Neurol.* 2017 Apr;290:106-114.
45. Yvon A, Faroni A, Reid AJ, Lees VC. Selective Fiber Degeneration in the Peripheral Nerve of a Patient With Severe Complex Regional Pain Syndrome. *Front Neurosci.* 2018 Apr 4;12:207.
46. Carozzi VA, Canta A, Chiorazzi A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: what do we know about mechanisms? *Neurosci. Lett.* 2015;596:90–107.