



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
ESTRUTURAL APLICADAS



TÁRIKA GONÇALVES DO CARMO OLIVEIRA

**EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA *BthTL* COMBINADO AO PEPTÍDEO DE  
AÇÃO MIMÉTICA AO TNF NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

Uberlândia, MG

2019

TÁRIKA GONÇALVES DO CARMO OLIVEIRA

**EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA *BthTL* COMBINADO AO PEPTÍDEO DE  
AÇÃO MIMÉTICA AO TNF NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Graciele Zanon

Uberlândia, MG

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural  
Aplicadas  
Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



## ATA

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número: 004/2019 do PPGBC

Data: **22 de Março de 2019**

Discente: **Tárika Gonçalves do Carmo Oliveira**

Matrícula nº 11712BCE005

Título do Trabalho: **“Efeito do selante de fibrina *BthTL* combinado ao peptídeo de ação mimética ao TNF na regeneração nervosa periférica”**

Área de concentração: Biologia Celular

Linha de Pesquisa: Mecanismos de Reparo e Plasticidade Tecidual

Projeto de Pesquisa vinculado:

## DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às quatorze horas do dia vinte e dois de março do ano de 2019 no Anfiteatro da Biblioteca, Bloco 4G – Campus Umarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: **Professores Doutores: Robson Aparecido dos Santos Boni – FACISB; Alexandre Barcelos Moraes da Silveira – UFU e Renata Graciele Zanon orientadora** da candidata. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa Profa. Dra. Renata Graciele Zanon apresentou a Comissão Examinadora e a candidata **Tárika Gonçalves do Carmo Oliveira**, agradeceu a presença do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Tárika Gonçalves do Carmo Oliveira** aprovada.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 16 horas e 15 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Graciele Zanon, Presidente**, em 22/03/2019, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Barcelos Morais da Silveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/03/2019, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **ROBSON APARECIDO DOS SANTOS BONI, Usuário Externo**, em 22/03/2019, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1088032** e o código CRC **4B127A83**.

---

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

O48e  
2019 Oliveira, Táríka Gonçalves do Carmo, 1995-  
Efeito do selante de fibrina BthTL combinado ao peptídeo de ação  
mimética ao TNF na regeneração nervosa periférica [recurso eletrônico]  
/ Táríka Gonçalves do Carmo Oliveira. - 2019.

Orientadora: Renata Graciele Zanon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.12>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Citologia. 2. Fibrina. 3. Bainha de Mielina. 4. Células de Schwann. 5. Nervos - Regeneração. I. Zanon, Renata Graciele, 1980-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 581

Rejâne Maria da Silva – CRB6/1925

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço, primeiramente, a Deus, pelas bênçãos derramadas em minha vida. Nada disso seria possível sem o Seu amor.*

*Aos meus pais, Cloris e Marcos, e meu irmão, Gustavo, pelo amor, pelos ensinamentos, pela torcida e apoio incondicional, por jamais deixarem de acreditar em mim e por ser meu porto seguro.*

*Aos meus tios e primos, em especial o Tio Elias, tia Eva e tio Elifras, pela torcida e por me ensinarem a valorizar mais a vida.*

*Aos amigos do ensino médio (Amanda, o Igor e a Bartira) e da graduação (Débora, Bruna, FerBus, Lenora, Luana e Ramon), por me acompanharem ao longo dessa jornada, por trazerem tanta leveza e amor à minha vida e pela torcida nessa reta final do mestrado.*

*Aos amigos da Fisiologia (Mateus, Maria Vitória e, em especial, o Victor Augusto), pela parceria e por todas as conversas e risada em meio à correria da pós.*

*Ao meu namorado, Douglas, por me proporcionar risos e calma nessa reta final.*

*À minha orientadora, prof. Dra. Renata Zanon, pela oportunidade, pela paciência, pelos diversos ensinamentos ao longo dos anos de mestrado e iniciação científica e por sua dedicação ao ensino e à pesquisa.*

*Ao pessoal do Laboratório de Morfologia e Cultura Celular, pela companhia e por me acolherem durante o Mestrado. Um agradecimento especial ao Raphael, pela parceria e por ter feito as imunos deste trabalho, e à Ana Claudia, pela parceria, amizade, conselhos e risadas nessa jornada; este trabalho é tão dela quanto desta que vos escreve (se não mais!).*

*Aos técnicos do Instituto de Ciências Biomédicas e da Faculdade de Medicina Veterinária, em especial à profa. Celina e aos técnicos Igor, Thaís e Lorena, pelo auxílio diante de dúvidas e por todo o suporte prestado.*

*Ao prof. Dr. Fábio de Oliveira e à Dra. Bruna Barbosa, ambos do laboratório de Biofísica da UFU, por cederem a enzima BthTL e por todo auxílio diante de dúvidas.*

*Ao prof. Dr. Carlos Ueira e sua aluna, doutoranda Jéssica Regina da Costa Silva, ambos do laboratório de Genética da UFU, por cederem o peptídeo de ação mimética ao TNF.*

*Aos profs. Drs. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira e Gustavo Ferreira Simões, por nos receberem na UNICAMP e pelo auxílio nos procedimentos de microscopia eletrônica de transmissão.*

*À profa. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki, por ter feito a análise histopatológica de nossos cortes e por sempre ter sido tão prestativa, paciente e gentil conosco.*

*À doutoranda Francielle Borges Rosa de Moura e à profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso, pelo grande auxílio com as colorações com picosirius red e por também sempre serem tão prestativas, pacientes e gentis conosco.*

*Ao prof. Dr. Roberto Bernardino Júnior que, pela sua pessoa e por meio de uma disciplina ministrada no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, me inspirou e incentivou ainda mais a seguir a Docência.*

*Ao prof. Dr. Alberto da Silva Moraes, por me apresentar à profa. Dra. Renata Zanon durante o período de iniciação científica. Assim como o prof. Roberto Bernardino Júnior, o prof. Alberto também é uma pessoa que me inspira a seguir a Docência.*

*Ao doutorando Alex Dias Assis, que conversou com a Profa. Dra. Renata Zanon quando eu estava terminando a graduação acerca da possibilidade de fazer o mestrado sob sua orientação. Também foi o Alex quem nos ensinou os procedimentos cirúrgicos e nos recebeu na UNICAMP. Esse trabalho também é tão dele quanto meu ou da Ana Cláudia!*

*À CAPES, por me conceder uma bolsa durante o período do mestrado.*

*À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, por proporcionarem minha formação acadêmica.*

*Por fim, aos profs. Drs. Alexandre Barcelos Moraes da Silveira e Robson Aparecido dos Santos Boni, por aceitarem o convite em compor a banca e pelas contribuições que fizeram ao trabalho.*

## RESUMO

Nas lesões em que se tem secção total do segmento nervoso (lesão do tipo neurotme), faz-se necessária intervenção cirúrgica. O uso de próteses tubulares que orientam e protegem a área de lesão e a possibilidade de, dentro dessa prótese, se inserir drogas e moléculas que atuem de forma positiva no processo de regeneração nervosa é uma perspectiva na clínica atual, podendo servir como alternativa às ferramentas cirúrgicas já utilizadas. Nosso objetivo foi investigar o efeito do selante de fibrina *BthTL* associado ou não ao peptídeo de ação mimética ao TNF, na regeneração axonal e na recuperação funcional do nervo isquiático após neurotme. Para tanto, submetemos ratos *Wistar* à neurotme do nervo isquiático esquerdo e posterior cirurgia de tubulização. Três grupos foram constituídos: tubo vazio, grupo tubo+cola (preenchido por selante de fibrina), e, grupo tubo+cola+pep (preenchido com selante misturado ao peptídeo de ação mimética ao TNF). Os animais foram analisados quanto a função sensitiva e motora ao longo de 45 dias. Ao final desse período, os animais foram eutanasiados e os nervos foram coletados para realização de imunomarcações (neurofilamento, GAP43, S100- $\beta$ , NGFRp75 e Iba-1) e de microscopia eletrônica de transmissão e de luz para a contagem de fibras regeneradas, degeneradas, amielínicas, além da análise morfométrica de fibras regeneradas (diâmetro das fibras mielínicas, diâmetro dos axônios mielínicos, espessura da bainha de mielina e razão g). Adicionalmente, realizou-se análise histopatológica nos nervos e coloração para colágeno. Em nossas análises, nenhum grupo mostrou recuperação funcional motora ou sensitiva. Intenso infiltrado inflamatório na presença do selante *BthTL* em associação ao peptídeo juntamente com uma maior expressão de Iba-1, e, aumento do receptor NGFRp75 que caracteriza fenótipo regenerativo das células de Schwann. Além disso, esse grupo apresentou maiores espessura de mielina e diâmetro da fibra e mais colágeno tipo III. Os nervos extraídos de tubos com selante apenas apresentaram resultados intermediários entre tubo vazio e tubo+cola+pep para NGFRp75, inflamação e colágeno, e, na contagem de fibras, mostrou mais fibras degeneradas e menos axônios amielínicos do que qualquer grupo. O grupo tubo vazio somente mostrou superioridade na expressão de GAP43. Esses resultados sugerem que o selante junto com o peptídeo induziram maior inflamação local influenciando as células de Schwann no sentido de atuarem positivamente no processo de regeneração nervosa periférica.

**Palavras-chave:** Nervo, Mielina, Tubulização, Selante, Célula de Schwann



## ABSTRAC

Surgical intervention is necessary whenever peripheral nerve laceration occurs. Using tubular prostheses that guide and protect injury area and the possibility of inserting, within this prosthesis, drugs and molecules that act positively in nerve regeneration is a perspective in the current clinics and can serve as an alternative for standard tools of nerve repair. Our aim was to investigate the effect of *BthTL* fibrin sealant, associated or not to a synthetic TNF mimetic peptide, on axonal regeneration and functional recovery of sciatic nerve after neurotmesis. For this purpose, *Wistar* rats were submitted to left sciatic nerve neurotmesis and subsequent tubulization surgery. Three groups were formed: empty tube, tube+glue group (filled with fibrin sealant), and tube+glue+pep group (filled with sealant mixed with TNF mimetic peptide). Animals were analyzed for sensory and motor function over 45 days. At the end of this period, animals were euthanized and nerves were collected for immunostaining (neurofilament, GAP43, S100- $\beta$ , NGFRp75 and Iba-1) and for transmission and light electron microscopy in order to count myelinated, unmyelinated and degenerated fibers, as well as for evaluation of the morphometric analysis of regenerated fibers (diameter of myelin fibers, diameter of myelin axons, thickness of myelin sheath and g ratio). Histopathological analysis and collagen staining were also performed. Our data did not show motor or sensory functional recovery. Intense inflammatory infiltrate with a higher Iba-1 expression and increased NGFRp75 receptor, which characterizes Schwann cell regenerative phenotype, was seen in the presence of the *BthTL* sealant associated to peptide. In addition, this group had higher myelin thickness and fiber diameter and more type III collagen. Nerves extracted from sealant tubes showed intermediate results between empty tube and tube+glue+pep for NGFRp75, inflammation and collagen; on fiber counts, these nerves showed more degenerate fibers and fewer unmyelinated axons than any group. Empty tube group showed superiority only in GAP43 expression. Altogether, our data suggest that the sealant associated to TNF mimetic peptide induced greater local inflammation influencing the Schwann cells in order to act positively in the process of peripheral nerve regeneration.

**Key words:** Nerve, Myelin, Tubulization, Sealant, Schwann Cell

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Esquema mostrando eventos após a lesão nervosa periférica.....	4
<b>Figura 2:</b> Tubulização na pesquisa básica e na prática clínica.....	6
<b>Figura 3:</b> Delineamento experimental.....	12
<b>Figura 4:</b> Dosagens de Il-1 $\beta$ e Il-10 após estímulos com os peptídeos.....	14
<b>Figura 5:</b> Etapas da cirurgia de tubulização.....	16
<b>Figura 6:</b> Aparato e cálculo utilizados para estimar o SFI.....	17
<b>Figura 7:</b> Teste de pressão crescente (Von Frey eletrônico).....	18
<b>Figura 8:</b> Avaliações funcionais e peso relativo do músculo tibial anterior.....	24
<b>Figura 9:</b> Cortes longitudinais de nervos corados com HE.....	25
<b>Figura 10:</b> Imunomarcações anti-Iba-1, anti-S100 $\beta$ e anti-NGFRp75 em nervos íntegros e em segmentos regenerados.....	27
<b>Figura 11:</b> Cortes longitudinais corados com picrosirius red.....	28
<b>Figura 12:</b> Imunomarcações anti-Neurofilamento e anti-GAP-43 em nervos íntegros e em segmentos regenerados.....	30
<b>Figura 13:</b> Vista panorâmica e com maior aumento de secções transversais de nervo isquiático íntegro e de segmentos regenerados dos grupos tubo vazio, tubo+cola e tubo+cola +pep.....	33
<b>Figura 14:</b> Contagem de Fibras e área da secção transversal de segmentos íntegros e regenerados.....	34
<b>Figura 15:</b> Ultraestrutura de secções transversais do nervo íntegro e de segmentos regenerados dos grupos tubo vazio, tubo+cola e tubo+cola+pep.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ARFIS: área de biofísica, fisiologia e farmacologia
- BDNF: fator de crescimento derivado do cérebro
- BSA: albumina sérica bovina
- CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio
- CBEA: centro de bioterismo e experimentação animal
- CS: células de Schwann
- DAM: diâmetro dos axônios mielinizados
- DFM: diâmetro das fibras mielinizadas
- DW: degeneração Walleriana
- EBM: espessura da bainha de mielina
- EIT: abertura dos dedos intermediários do lado lesionado
- EPL: comprimento da pegada do lado lesionado
- ETS: abertura total dos dedos do lado lesionado
- GDNF: fator neurotrófico derivado do da glia
- GRD: gânglio da raiz dorsal
- ICBIM: Instituto de Ciências Biomédicas
- IL1 $\beta$ : interleucina 1-beta
- IL6: interleucina 6
- IL10: interleucina 10
- IT: abertura dos dedos intermediários
- LIF: fator inibidor de leucemia
- MB: membrana basal
- MCP-1: proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1
- MET: microscopia eletrônica de transmissão
- mTNF: precursor do fator de necrose tumoral

NIT: abertura dos dedos intermediários do lado normal

NGF: fator de crescimento neuronal

NTS: abertura total dos dedos no lado normal

PBS: tampão fosfato salino

PL: comprimento da pegada

RZG: razão G

SFI: índice funcional do isquiático

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

TNF: fator de necrose tumoral

TNFR1: receptor de tipo 1 para o fator de necrose tumoral

TNFR2: receptor de tipo 2 para o fator de necrose tumoral

TS: abertura total dos dedos

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Grupos Experimentais.....	13
<b>Tabela 2:</b> Anticorpos primários utilizados no presente trabalho e sua respectiva marcação.....	20
<b>Tabela 3:</b> Análise morfométrica (Médias $\pm$ Erro padrão).....	32
<b>Tabela 4:</b> Tratamento estatístico dos dados morfométricos.....	32
<b>Tabela 5:</b> Resumo dos resultados para regeneração nervosa periférica.....	37

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Referencial Teórico.....</b>	<b>2</b>
2.1. Nervos periféricos: função e características estruturais.....	2
2.2. Lesão e Regeneração em Nervos Periféricos.....	3
2.3. Tubulização e os condutores nervosos artificiais.....	5
2.4. Selantes de Fibrina.....	7
2.5. Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) e Regeneração Nervosa: perspectiva para o uso de peptídeo ligante de receptor de TNF $\alpha$ associado ao selante de fibrina.....	9
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>11</b>
3.1. Objetivo Geral.....	11
3.2. Objetivos Específicos.....	11
<b>4. Metodologia.....</b>	<b>12</b>
4.1. Animais.....	12
4.2. Síntese do selante de fibrina do peptídeo mimético ao TNF.....	13
4.3. Procedimentos cirúrgicos para a tubulização.....	15
4.4. Análises Funcionais.....	16
4.4.1. Análise do índice funcional do isquiático (SFI).....	16
4.4.2. Análise da sensibilidade – Teste de Pressão Crescente (Von Frey Eletrônico)..	18
4.5. Imunofluorescência.....	19
4.6. Análise histopatológica e de colágeno.....	20
4.7. Microscopia de luz e microscopia eletrônica de Transmissão (MET).....	21
4.8. Morfometria e contagem de fibras regeneradas.....	22
4.9. Análise estatística.....	22
<b>5. Resultados.....</b>	<b>23</b>
5.1. Ausência de recuperação motora e sensitiva nos três grupos experimentais.....	23
5.2. Intenso infiltrado inflamatório na presença do selante <i>BthTL</i> em associação ao peptídeo de ação mimética ao TNF.....	24

5.3	Maior expressão de NGFRp75 em nervos regenerados do grupo selante <i>BthTL</i> associado ao peptídeo de ação mimética ao TNF.....	25
5.4.	Deposição de colágeno tipo III semelhante aos nervos íntegros no grupo tubo+cola+pep.....	26
5.5.	Maior expressão de GAP-43 em nervos regenerados do grupo tubo vazio.....	29
5.6.	Nervos regenerados do grupo tubo+cola apresentaram o dobro da quantidade de fibras degeneradas e menor quantidade de fibras amielínicas. A associação do selante ao peptídeo de ação mimética ao TNF proporciona maior DFM, EBM e RZG.....	31
5.7.	Os resultados apontam que o grupo tubo+cola+pep teve maior eficiência na regeneração nervosa periférica.....	36
<b>5.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>56</b>
	Anexo A: Certificado de aprovação do projeto pela CEUA-UFU.....	56
	Anexo B: Descrição histopatológica dos nervos.....	57

## 1. INTRODUÇÃO

Lesões traumáticas em nervos periféricos são bastante comuns e resultam em dor, comprometimento motor e possibilidade de injúrias secundárias, como fraturas e quedas. Diante de secção total do segmento nervoso (lesão do tipo neurotmeze) é necessária intervenção cirúrgica a fim de promover realinhamento dos cotos e, assim, tentar recuperar a função comprometida. Os procedimentos cirúrgicos, entretanto, possuem algumas limitações (ex: risco de infecção e de dano aos vasos sanguíneos que suprem os segmentos íntegros, ausência de sítios doadores em caso de lesões múltiplas, dentre outras), as quais têm motivado a busca por técnicas alternativas de reparo de nervos periféricos.

A tubulização consiste em suturar os cotos no interior de tubos condutores a fim de garantir alinhamento dos segmentos, maior difusão de fatores tróficos e menor invasão de tecido fibroso. O procedimento tem sido estudado e utilizado como uma alternativa às técnicas de reparo consideradas padrão-ouro na prática clínica. Em tubos artificiais, acredita-se que a adição de substâncias ao lúmen pode proporcionar uma matriz interna propícia à reestruturação do axônio, auxiliando, assim, a regeneração do segmento nervoso e a recuperação funcional da área lesionada.

Considerando o sucesso do uso de selantes de fibrina em neurocirurgia e no reparo de nervos periféricos, além de seu possível uso como veículo de entrega de drogas, é de se esperar que a adição de um novo selante obtido a partir de peçonha de *Bothrops moojeni* ao lúmen de tubos de silicone apresente efeitos sobre a regeneração de nervo periférico após neurotmeze, prevenindo a dor neuropática e proporcionando a recuperação funcional do alvo denervado. Adicionalmente ao selante, foi utilizado um peptídeo sintético de ação mimética ao TNF com o intuito de influenciar a atividade das células de Schwann, que são células periféricas gliais que atuam ativamente na regeneração do nervo após lesão.

Nesse contexto, propusemos uma investigação morfofuncional sobre a reconstituição nervosa periférica empregando-se, no interior dos tubos, novos materiais desenvolvidos na própria Universidade Federal de Uberlândia: o selante de fibrina *BthTL* e o peptídeo de ação mimética ao TNF. Nossa perspectiva foi contribuir com técnicas de reparo de nervo periférico que tenham maior eficiência, possibilitando uma nova opção na prática clínica como monoterapia ou como adjuvante dos protocolos existentes para tratamento de injúrias que acometam nervos periféricos.



## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Nervos periféricos: função e características estruturais**

Nervos periféricos são componentes do Sistema Nervoso cuja função é promover a comunicação entre as estruturas nervosas centrais e os demais órgãos e tecidos que compõem o indivíduo, garantindo-lhe a execução de movimentos, a percepção de estímulos sensoriais, a interação com seus semelhantes e com o meio que o cerca (KANDEL et al, 2013).

Morfológicamente, os nervos periféricos são vistos como cordões esbranquiçados formados por um conjunto de axônios mielinizados e não mielinizados que, por sua vez, se organizam em feixes paralelos. As fibras mielinizadas têm partes de seu axônio revestidas por uma estrutura especializada das células de Schwann (CS) denominada Bainha de Mielina, que garante isolamento elétrico nas porções em que se encontra e, entre elas, permanecem pequenos espaçamentos livres (os nódulos de Ranvier), através dos quais os impulsos nervosos se propagam de maneira saltatória e rápida. Os axônios não mielinizados, por outro lado, encontram-se revestidos apenas pela membrana plasmática das CS e, em função disso, apresentam uma lenta propagação do impulso nervoso. É válido ressaltar, ainda, que as CS garantem suporte estrutural regenerativo às fibras nervosas, servindo como guia para o seu correto crescimento em resposta às lesões (KANDEL et al, 2013, SIMIONESCU, 2016).

Além de fibras nervosas, os nervos periféricos apresentam outros componentes estruturais. Envolvendo cada uma das fibras tem-se um tecido conjuntivo frouxo denominado endoneuro, que consiste em fibroblastos dispersos, fibras colágenas e fibras reticulares sintetizadas pelas CS. Um conjunto de fibras é nomeado fascículo, o qual, por sua vez, é envolto por um segundo tecido conjuntivo - o perineuro - formado por camadas concêntricas de fibroblastos modificados que se ligam por meio de zônulas de oclusão, garantindo proteção aos agentes nocivos e às alterações repentinas na composição iônica axonal. Conjuntos de fascículos formam o nervo periférico, o qual é revestido em toda sua extensão por um terceiro tecido conjuntivo denominado epineuro, este classificado como denso não modelado e com a função de garantir proteção, resistência e certa elasticidade ao segmento nervoso. Os nervos periféricos, por fim, recebem suporte metabólico a partir de uma rede arterial rica em vasos colaterais que se dispõem em seu entorno e interior (SIQUEIRA, 2007; MONTANARI, 2016).

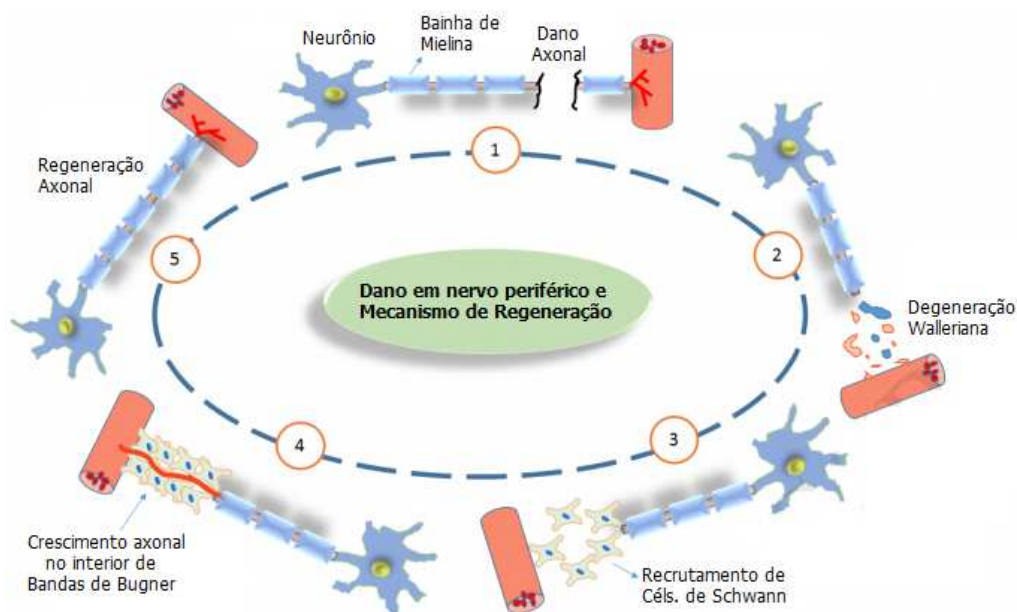
## 2.2. Lesão e regeneração em nervos periféricos

As lesões em nervos periféricos são muito comuns, dada a ampla distribuição dessas estruturas em todo o organismo. Dentre as principais causas relacionadas às injúrias em nervos periféricos destacam-se os traumas de estiramento nervoso (vistos, por exemplo, em acidentes de veículos motorizados e em quedas) e as lesões por percussão (ocasionadas por ferimentos com armas brancas ou de fogo, dentre outros). São vistas com certa frequência, também, injúrias de causa autoimune (como a Síndrome de Guillain-Barré), iatrogênicas (cirurgias, aplicações de anestésicos e tratamentos com quimioterápicos) e, ainda, lesões decorrentes de desordens metabólicas, como é o caso da neuropatia diabética (KANDEL et al, 2013; JONES, EISENBERG E JIA, 2016). Quanto aos efeitos gerados por esse tipo de lesão, destacam-se a dor neuropática, o comprometimento da função motora (dada a perda de junções neuromusculares e fibrose muscular) e o maior risco de lesões secundárias, como quedas e fraturas (MASSING et al, 2009; SULLIVAN et al, 2016).

As lesões em nervos periféricos são classificadas em três tipos (neuropraxia, axonotmese e neurotmese), que se diferenciam pelo grau de acometimento dos componentes estruturais, pela severidade e pela extensão da injúria. A neuropraxia é definida como uma lesão leve que resulta em desmielinização focal sem perda da integridade axonal; ocorrem fraqueza e ausência sensitiva momentaneamente, com recuperação em horas, dias ou semanas. A axonotmese é caracterizada por dano irreversível sobre o axônio sem comprometimento, entretanto, do epineuro e do perineuro, fato que pode possibilitar a recuperação do nervo a depender de suas particularidades anatômicas, complexidade funcional e seu grau de desorganização após lesão. Na neurotmese, por fim, tem-se secção completa do segmento nervoso com complicações irreversíveis sobre o axônio, a bainha de mielina e o epineuro, o que torna necessária intervenção cirúrgica a fim de garantir alinhamento aos cotos (SIMIONESCU, 2016; SULLIVAN et al, 2016).

Após a lesão, ocorrerá degeneração de fibras nervosas no segmento nervoso distal ao dano em 48-96 horas, que é o primeiro passo de uma série de eventos que preparam o ambiente para regeneração (Figura 1). A esses eventos denomina-se “degeneração Walleriana” (DW). Nesse processo, as CS perdem o arranjo de mielina e proliferam. Tanto as CS quanto os axônios lesionados passarão a secretar fatores tróficos – como TNF e IL-1 $\beta$  – que levam à ativação e recrutamento de macrófagos. Ao chegar ao local da lesão, os macrófagos eliminarão os debris de mielina junto com as CS e produzirão mediadores que

facilitam a migração de CS, originando as chamadas “bandas de Büngner”, um ambiente de morfologia tubular que permite o crescimento e a orientação dos axônios acometidos pela lesão. Já no coto proximal do nervo, as fibras degeneram de maneira retrógrada até chegar ao próximo nódulo de Ranvier do local da lesão. Nesses axônios, originam-se cones de crescimento a partir dos quais ocorre a regeneração ao longo das bandas de Büngner. Na segunda após a lesão, com a instalação da DW, iniciam-se mecanismos de mudanças no corpo celular, que podem ser estruturais e funcionais. Primeiro, ocorre aumento do volume do corpo celular; em seguida, há um deslocamento do núcleo para a periferia e dispersão dos corpúsculos de Nissl, denominado cromatólise. Lesões próximas ao corpo do neurônio podem levar à morte do corpo celular (GAUDET, POPOVICH, RAMER, 2011; ROTSHENKER, 2011; SULLIVAN et al, 2016).



**Figura 1:** Esquema mostrando os eventos após lesão nervosa periférica.

*Fonte: SARKER et al. (2018), com adaptações.*

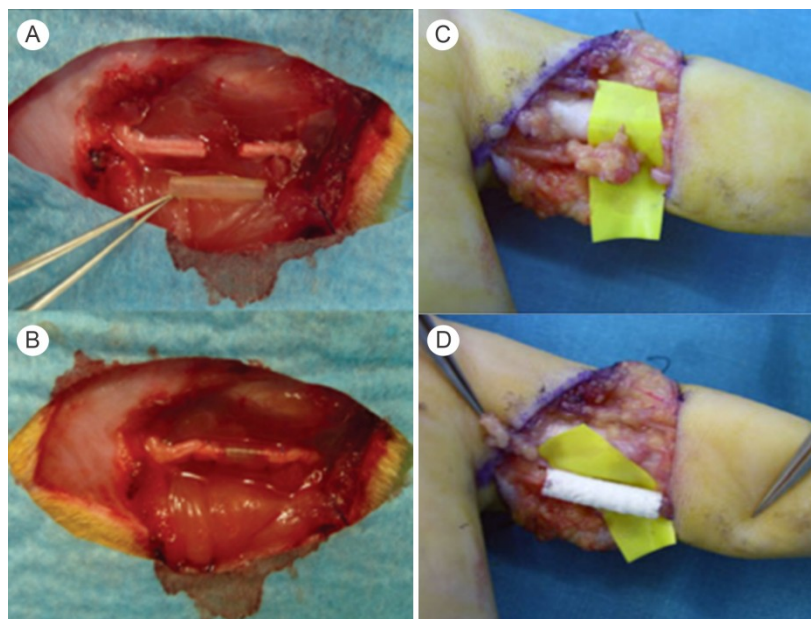
O tipo de intervenção cirúrgica em casos de neurotmeose varia conforme o tamanho da lesão. Em secções totais de curta extensão opta-se por realizar a neurorrafia, isto é, a união dos cotos seguida da sutura do epineuro. Já em casos de lesões de grande comprimento ou de perda importante de tecido neural, a técnica considerada padrão-ouro é o enxerto autólogo de nervo, sendo o nervo sural o doador mais comum (JONES, EISENBERG E JIA, 2016; PFISTER et al, 2007).

Independentemente do tipo de procedimento cirúrgico a ser adotado, as complicações são comuns: existe o risco de danos dos vasos sanguíneos que suprem os segmentos nervosos íntegros e de desenvolvimento de infecções (NARYAN, ARUMUGAM, CHITTORIA, 2019). No caso do enxerto autólogo, em específico, têm-se também, como limitações, a baixa disponibilidade de sítios doadores em caso de lesões múltiplas e a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para retirada do fragmento de nervo saudável, o que pode ocasionar déficit sensitivo na região e outras complicações (formação de neuroma, por exemplo), além da possibilidade de trauma no segmento doador (JOHNSON, ZOUBOS E SOUCACOS, 2005; PFISTER et al, 2007; NARYAN, ARUMUGAM, CHITTORIA, 2019). Tais desvantagens têm motivado uma busca da comunidade científica por alternativas ao enxerto autólogo, e é nesse contexto que o uso de condutores nervosos tem recebido especial atenção nas pesquisas básicas e clínicas (KRIEBEL et al, 2017).

### **2.3. Tubulização e condutores nervosos artificiais**

A tubulização é uma técnica cirúrgica projetada para interligar o espaço deixado pela secção total de um segmento nervoso que não é passível de neurografia ou enxerto. O procedimento tem por objetivo direcionar o crescimento dos axônios durante o processo de regeneração, garantindo a difusão de fatores neurotróficos e minimizando a infiltração de tecido fibroso (JOHNSON, ZOUBOS E SOUCACOS, 2005; RICCIO et al, 2018.). Essa técnica consiste na inserção dos cotos proximal e distal no interior de uma prótese tubular, os quais são em seguida suturados à extremidade do tubo condutor (Figura 2) que, por sua vez, proporcionará o correto alinhamento dos cotos para posterior regeneração axonal (FIELDS et al, 1989).

A cirurgia de tubulização tem sido estudada e aplicada em lesões de nervos periféricos mais extensas, podendo funcionar como uma alternativa às técnicas de reparo já padronizadas (LUNDBORG et al, 2004; OLIVEIRA et al, 2004). Numa meta-análise sobre intervenções cirúrgicas no reparo de nervos sensitivos em humanos, Naryan e colaboradores (2019) evidenciaram que o uso de condutores nervosos apresentou melhor efeito funcional quando comparado às suturas convencionais. Os autores reforçam, por outro lado, a necessidade de mais estudos a fim de verificar a eficácia desses materiais no reparo de nervos motores e mistos, de nervos profundos, cranianos e de plexos nervosos.



**Figura 2:** Tubulização na pesquisa básica e na prática clínica. **A e B:** Tubulização de nervo isquiático esquerdo em rato. O tubo condutor à base de colágeno foi usado para reparar o espaço de 1 centímetro que ficou entre os cotos. **C e D:** Tubulização de nervo digital colateral do primeiro dedo.

*Fonte: figuras 2A e 2B - Panagopoulos e colaboradores (2017);  
figuras 2C e 2D - Riccio e colaboradores (2018).*

Vários materiais de natureza biológica e, mais recentemente, sintética, têm sido testados como potenciais candidatos às próteses tubulares para cirurgia de tubulização (JOHNSON, ZOUBOS E SOUCACOS, 2005). Os condutores biológicos - dos quais se destacam o colágeno autólogo e os enxertos de vasos sanguíneos ou de músculo estriado esquelético - apresentam maior potencial regenerativo, entretanto, sua eficácia é bastante restrita ao tamanho da lesão, apresentando melhores resultados em espaços menores que 30 mm (CHIU, 1999; FANSA et al, 2001). Os condutores artificiais - dentre os quais se destacam os polímeros de lactato, as malhas de poliglactina e os tubos de silicone - têm um bom efeito regenerativo em lesões que geram grandes espaços entre os cotos; é válido ressaltar, ainda, que os tubos de silicone têm sido amplamente utilizados no estudo de eventos biológicos que ocorrem durante a regeneração nervosa. Os materiais artificiais, entretanto, são limitados pela ausência de uma arquitetura interna que proporcione o crescimento e orientação dos axônios e das CS de fenótipo regenerativo (JOHNSON, ZOUBOS E SOUCACOS, 2005; JONES, EISENBERG E JIA, 2016; PFISTER et al, 2007).

Visando favorecer a presença de uma arquitetura interna adequada aos condutores nervosos sintéticos, acredita-se que o emprego de aditivos ao lúmen dos tubos possa funcionar como uma matriz que proporcione a proliferação e o alinhamento de CS, componentes celulares de fundamental importância para a regeneração de nervos periféricos (JONES,

EISENBERG E JIA, 2016). Tal hipótese pode ser sustentada por alguns estudos: ao preencherem tubos de silicone com um gel à base de colágeno, laminina e fibronectina, Chen e colaboradores (2000) evidenciaram melhor organização dos axônios nos segmentos regenerados em comparação às próteses tubulares vazias. Também usando tubos de silicone, Wu e colaboradores (2008) os preencheram com ácido valproico, um antiepiléptico que, dentre outros efeitos, parece aumentar os níveis de proteína 43 associada ao cone de crescimento (GAP-43) na medula espinhal, uma molécula bastante expressa no desenvolvimento e no processo de regeneração axonal. Por meio de análises funcionais, eletrofisiológicas e morfométricas, os autores conseguiram demonstrar, por fim, que os tubos preenchidos com a substância em questão apresentaram melhores efeitos sobre a regeneração axonal quando comparados aos condutores vazios.

#### **2.4. Selantes de fibrina**

Os selantes de fibrina (ou colas de fibrina) são biomateriais viscosos compostos por fibrinogênio e trombina combinados apenas no momento da aplicação do produto: tal qual ocorre na coagulação sanguínea, a trombina converte o fibrinogênio em fibrina por meio de uma reação enzimática, gerando uma solução de rápida solidificação que adere ao tecido. O resultado é um produto que em muito facilita a cicatrização de feridas, principal aplicação desse material (ATRAH, 1994).

Os componentes das colas de fibrina podem ser misturados e processados em diferentes formas, como em hidrogéis ou microesferas de fibrina (CARLESS, 2002). Oliveira e colaboradores (2016) demonstraram ser possível induzir a formação de selante de fibrina misturando-se 5 µg de uma nova serina protease patenteada com o nome “*BthTL*” (obtida a partir de peçonha da serpente *Bothrops moojeni*) a uma solução saturada de fibrinogênio bovino. Os pesquisadores afirmaram que o selante em questão permaneceu estável por mais de dez dias e que seu tempo de degradação não alterou na presença de íons  $Ca^{2+}$  ou aprotinina. Tais características podem permitir o uso do selante produzido como agente hemostático em diversos procedimentos cirúrgicos (como esplenectomia, trauma hepático, cirurgia cardiotorácica, microcirurgia oftálmica, entre outros) e como um vedante em rupturas de nervos e tendões (BARROS et al, 2011; KRAM et al, 1990; OLIVEIRA et al, 2016).

Os selantes de fibrina já são utilizados em neurocirurgia com o objetivo de melhorar a circulação sanguínea encefálica, conter sangramentos venosos em determinadas áreas

cerebrais e, ainda, na ressecção de tumores metastáticos no cérebro. Em todos os casos, não houve evidências de danos sobre células nervosas (OKUDA et al, 2014; PARENTI E LENZI, 1986; SEKHAR et al, 2007).

Quanto ao uso de colas de fibrina no reparo de nervos periféricos, estudos não têm evidenciado prejuízos sobre o crescimento axonal ou sobre a recuperação funcional de sítios lesionados (TSE E KO, 2012; RAFIJAH et al, 2013). Pelo contrário: na prática clínica, pesquisadores já demonstraram que os selantes de fibrina podem ser uma boa alternativa à microcirurgia de reparo por sutura do epineuro, uma vez que possibilita o encurtamento do tempo de cirurgia, fator crucial para a recuperação do segmento lesionado (WHITLOCK et al, 2010). Além disso, os selantes de fibrina também auxiliam a reduzir a inflamação associada à sutura, além de promover melhora no processo regenerativo axonal (BISCOLA et al, 2017).

O uso de selantes de fibrina aliado à técnica de tubulização parece ser benéfico ao reparo de nervos periféricos. Acreditando que a presença de uma matriz de fibrina no interior de tubos condutores poderia resultar em uma distribuição mais homogênea de CS e de células mesenquimais diferenciadas, Kalbermatten e colaboradores (2008) demonstraram que os selantes de fibrina auxiliam na aderência destas células ao lúmen de condutores artificiais; ao utilizar tais próteses no reparo de nervo isquiático lacerado de ratos adultos, os autores obtiveram maior distância do segmento regenerado em comparação aos tubos vazios. Seguindo essa mesma ideia, Cartarozzi e colaboradores (2015) preencheram condutores artificiais com selante de fibrina associado a células-tronco mesenquimais para reparo de nervo isquiático; por meio de análises histológicas, eletrofisiológicas e funcionais, os autores evidenciaram maior eficiência destas próteses sobre a regeneração axonal em comparação a tubos vazios. Pertici e colaboradores (2014), por fim, demonstraram que o uso de selante de fibrina associado à tubulização no reparo de nervo fibular permitiu melhora funcional sem formação de neuromas.

Ainda sobre o uso de selantes de fibrina no reparo de nervos periféricos, acredita-se que tal material deva possuir propriedades biológica, mecânica e técnica específicas. Como propriedade biológica, o selante de fibrina deve apresentar mínimo risco de transmissão de doenças, antigenicidade ou toxicidade, não deve induzir fibrose (o que poderia levar à compressão do nervo) e não pode agir como uma barreira para a regeneração axonal. Quanto à propriedade mecânica, espera-se que a adesão produzida pela cola de fibrina proporcione adequada resistência mecânica a fim de evitar rupturas e que não apresente alterações físico-químicas repentinas durante o reparo inicial ou no período pós-operatório. Como propriedade

técnica, deve ser de fácil utilização e manuseio, proporcionando redução do tempo operatório (TSE E KO, 2012). Outra propriedade de destaque é a capacidade da fibrina de se associar a outras moléculas e fármacos via ligações covalentes, impregnação ou, ainda, por meio do estabelecimento de sistemas à base de afinidade (LITVINOV E WEISEL, 2016) permitindo que o selante atue, por exemplo, como veículo de entrega de drogas (BUCHTA et al, 2004).

## **2.5. Fator de necrose tumoral (TNF) e regeneração nervosa: perspectiva para o uso de peptídeo ligante de receptor de TNF associado ao selante de fibrina**

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória secretada principalmente por macrófagos e monócitos, estando relacionada com a regulação da imunidade inata (HORIUCHI et al, 2010). Essa citocina é sintetizada como um precursor transmembrânico (mTNF), possuindo 26-kDa. O mTNF pode ser clivado por ação da enzima conversora de TNF, quando passa, então, a adquirir característica solúvel e possuir um peso molecular de 17-kDa (BASTIEN E LACROIX, 2014; HORIUCHI et al, 2010).

O TNF interage com dois tipos de receptores transmembrânicos: o receptor para TNF tipo 1 (TNFR1) e o receptor para TNF de tipo 2 (TNFR2). O TNFR1 é bastante expresso no Sistema Nervoso Central (SNC) e possui maior afinidade ao TNF solúvel; esse receptor tem um domínio de morte o qual, uma vez ativo, pode levar ao controle da expressão de proteínas anti-apoptóticas ou, ainda, conduzir a célula à apoptose ou à necroptose. O TNFR2, por outro lado, é mais expresso pela microglia e pelas células endoteliais e interage preferencialmente com o mTNF; uma vez ativo, o receptor TNFR2 induz a expressão de fatores pró-inflamatórios e anti-apoptóticos (BASTIEN E LACROIX, 2014). Ambos os receptores estão presentes em CS, onde medeiam diversas funções biológicas (YUAN et al, 2012).

A literatura relata tanto efeitos neuroprotetores quanto neurodegenerativos do TNF sobre diversas injúrias ao SNC (BASTIEN E LACROIX, 2014). Chen e colaboradores (2011), por exemplo, sugerem que o bloqueio do TNF por meio da administração sistêmica de um antagonista da citocina durante a fase aguda da injúria medular leva à redução da apoptose em oligodendrócitos e neurônios, bem como do dano tecidual e da desmielinização, além de uma melhora a recuperação motora, o que evidencia o papel neurodegenerativo da citocina. Genovese e colaboradores (2008) realizaram deleção do gene para TNFR1 e bloqueio de TNF e verificaram mesmos resultados que Chen e colaboradores. Por outro lado, Lambertsen e colaboradores (2009) evidenciaram efeito neuroprotetor da TNF em modelo de isquemia



cerebral, onde camundongos nocaute para a citocina apresentaram um exacerbado infarto cortical e maior déficit comportamental após injúria.

Quanto ao efeito do TNF sobre lesões no Sistema Nervoso Periférico (SNP), sabe-se que esta citocina está relacionada com o recrutamento de macrófagos e consequente aumento da fagocitose de debris de mielina por essas células, etapa de extrema importância para uma regeneração axonal bem-sucedida. As CS secretam tanto TNF quanto Il-1 $\beta$  em resposta à axotomia, e o pico de secreção dessas citocinas ocorre após aproximadamente dois dias de início da injúria. Observa-se, entretanto, uma diminuição abrupta na taxa de secreção de ambas as citocinas já no terceiro dia após a lesão, o que coincide com um aumento no número de macrófagos de perfil M2, responsáveis pelo reparo tecidual (ROTSHENKER, 2011). Por outro lado, Kato e colaboradores (2010) relataram que a terapia imediata com antagonista de TNF logo após a lesão em nervo isquiático gera aumento na regeneração axonal. Evidencia-se, portanto, que, tal qual ocorre no SNC, há divergências na literatura no que diz respeito ao efeito do TNF após lesões nos nervos periféricos, o que reforça a necessidade de mais estudos a fim de esclarecer a ação desta citocina após injúrias.

Com o objetivo de mapear e caracterizar peptídeos ligantes ao receptor do TNF a fim de obter novas moléculas imunomoduladoras, os pesquisadores Jéssica Regina da Costa Silva e Carlos Ueira Vieira, ambos do Instituto de Biotecnologia “Warwick Estevam Kerr” da Universidade Federal de Uberlândia, desenvolveram peptídeos de ação mimética ao TNF por meio da técnica de *Phage Display*. Os peptídeos foram sintetizados e testados tanto *in vitro* (através de estímulos em cultura e quantificação da ativação do NF- $\kappa$ B) quanto *in vivo* (via ensaios da resposta inflamatória induzida por implantes sintéticos seguida da realização de dosagem bioquímica de alguns componentes da resposta inflamatória). Ao final do trabalho, evidenciou-se que um dos peptídeos produzidos tinha ação mimética ao TNF, uma vez que seu comportamento tanto *in vitro* como *in vivo* é semelhante àquele da citocina inteira (SILVA et al, 2015).

Considerando que o aprisionamento de fatores de crescimento a uma matriz seguida da inserção do conjunto ao lúmen de um condutor nervoso possa ser uma ferramenta útil para prolongar a biodisponibilidade da molécula sobre o local da lesão (PFISTER et al, 2007), e tendo em vista o importante papel pró-inflamatório do TNF e sua interação com as CS, acredita-se que o prolongamento de sua disponibilidade no local da injúria pode ter efeitos benéficos para a regeneração nervosa vista a possibilidade de influência na DW e posterior crescimento axonal.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar o efeito do selante de fibrina *BthTL* com e sem associação ao peptídeo mimético de TNF na regeneração nervosa periférica.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Analisar a recuperação funcional sensitiva e motora do nervo isquiático tubulizado com prótese de silicone preenchida com selante de fibrina com e sem associação ao peptídeo mimético ao TNF;
- Estudar a resposta das células de Schwann no nervo isquiático tubulizado com prótese de silicone preenchida com selante de fibrina com e sem associação ao peptídeo mimético ao TNF;
- Avaliar a presença de células inflamatórias e produção de colágeno no nervo isquiático tubulizado com prótese de silicone preenchida com selante de fibrina com e sem associação ao peptídeo mimético ao TNF;
- Estudar o processo de crescimento axonal do nervo isquiático tubulizado com prótese de silicone preenchida com selante de fibrina com e sem associação ao peptídeo mimético ao TNF.

## 4. METODOLOGIA

O esquema a seguir mostra o delineamento experimental do trabalho.

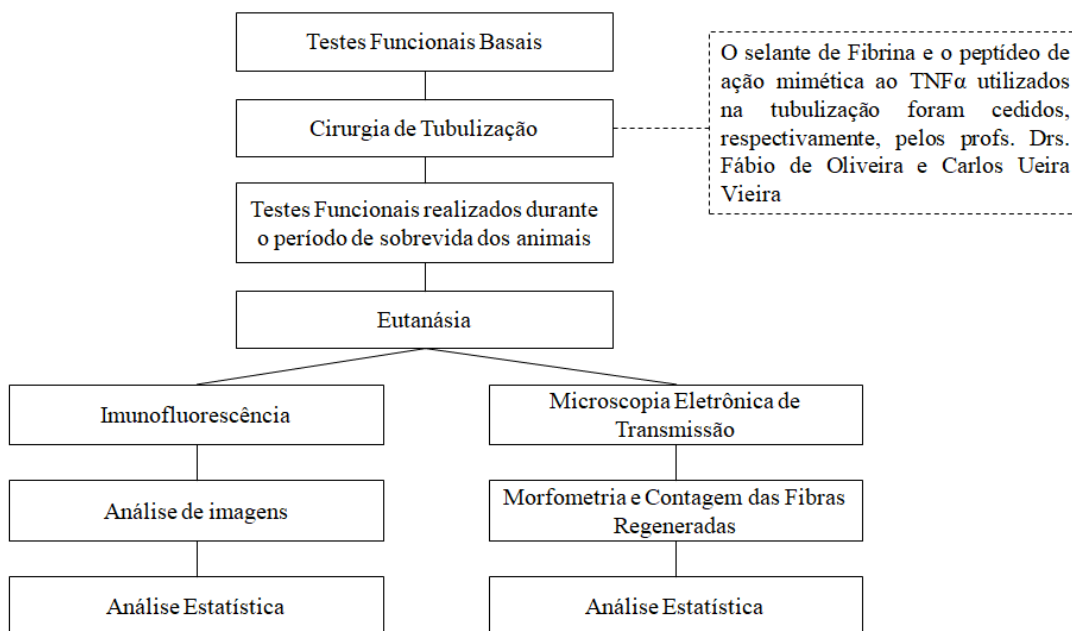


Figura 3: Delineamento Experimental.

### 4.1. Animais

Foram utilizados 30 ratos *Wistar* machos e adultos (oito semanas de idade), com peso corporal entre 200 e 250g. Os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA - UFU) e foram alojados em depósito de animais localizado na Área de Biofísica, Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ARFIS - ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia, onde ficaram sujeitos a ciclos de luz/escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à água e comida. Os experimentos deste projeto foram conduzidos conforme as normas do Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU: protocolo 063/17; anexo A).

Os animais deste projeto foram divididos em três grupos experimentais, a depender da prótese tubular de silicone inserida após secção total do nervo isquiático esquerdo. Metade de cada grupo foi direcionada para técnicas de análise diferentes (Tabela 1). O nervo isquiático

direito não foi submetido à neurotmeze, sendo por isso utilizado como controle interno para análise dos resultados.

**Tabela 1:** Grupos Experimentais

<b>Grupos</b>	<b>Imunofluorescência</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Transmissão</b>
<b>Grupo tubo vazio</b> (Neurotmeze + tubo de silicone)	N = 5 animais	N = 5 animais
<b>Grupo tubo+cola</b> (Neurotmeze + tubo de silicone preenchido por selante de fibrina)	N = 5 animais	N = 5 animais
<b>Grupo tubo+cola+pep</b> (Neurotmeze + tubo de silicone preenchido por selante misturado ao peptídeo mimético ao TNF)	N = 5 animais	N = 5 animais

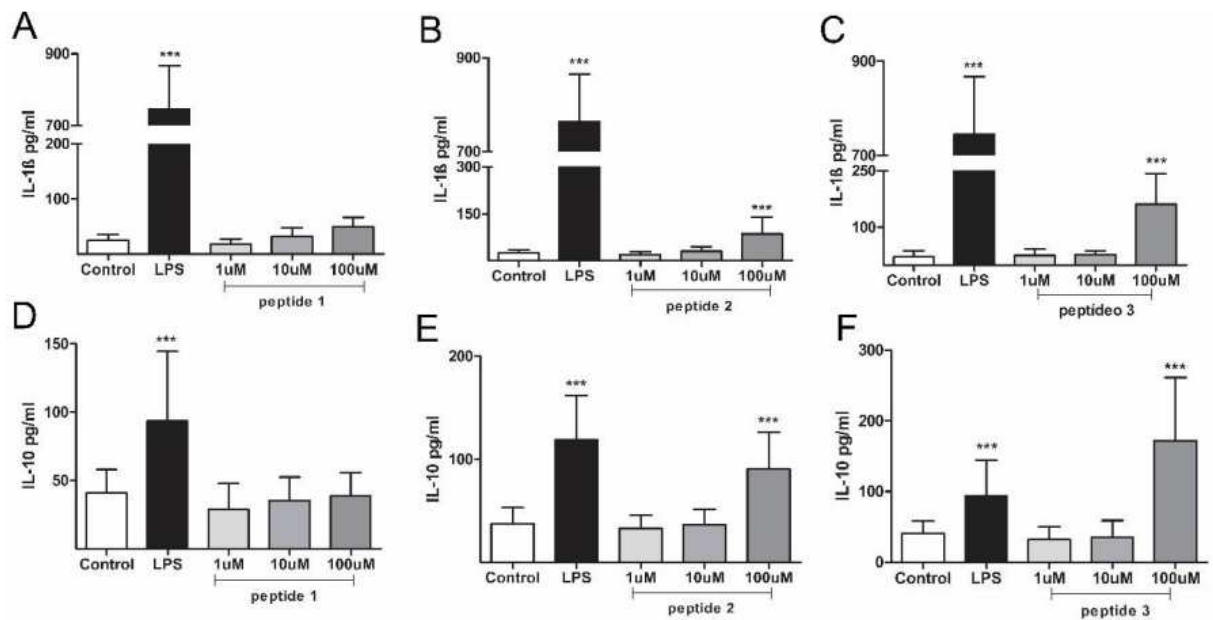
#### **4.2. Síntese do selante de fibrina e do peptídeo mimético ao TNF**

Selante de fibrina e o peptídeo mimético ao TNF foram doados prontos para testes em nosso laboratório. Portanto, vamos aqui resumir brevemente os procedimentos realizados pelos pesquisadores que os desenvolveram.

O selante de fibrina introduzido no interior das próteses de silicone foi desenvolvido pelos pesquisadores Fábio de Oliveira e Maria Inês Homs Brandeburgo, ambos da Universidade Federal de Uberlândia, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), sendo registrado com número de patente PI-0406273-6. A fabricação do selante de fibrina foi realizada conforme protocolo descrito por Kram e colaboradores (KRAM et al, 1990), com algumas modificações. Resumidamente, uma fração serina protease do veneno bruto da *Bothrops moojeni* foi isolada e nomeada “*BthTL*”. O coágulo de fibrina foi formado pela adição de 5 µg de *BthTL*, na presença de CaCl<sub>2</sub> 10 mM (1: 250), a uma solução de fibrinogênio bovino (Sigma) altamente concentrada (100 mg/ml de solução salina) (OLIVEIRA et al, 2016).

O peptídeo mimético ao TNF introduzido junto ao selante de fibrina no interior das próteses tubulares de silicone foi desenvolvido pelos pesquisadores Jéssica Regina da Costa Silva e Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, ambos da Universidade Federal de Uberlândia, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A fabricação do peptídeo mimético ao TNF foi realizada conforme protocolo descrito por Smith (SMITH, 1985). Resumidamente, por meio da tecnologia *Phage Display*, os pesquisadores conseguiram mapear ligantes aos receptores do TNF que pudessem atuar como imunomoduladoras do sistema imune. Nesse processo, foram obtidos três peptídeos: o peptídeo 1, de carga neutra, cuja sequência de aminoácidos é ACLWPYDARCGSSS, o peptídeo 2, com carga básica e sequência de aminoácidos ACVFPSSLRCGSSS, e, por último, o peptídeo 3, de carga ácida e com sequência de aminoácidos ACLYPFLLDGSSS. Os pesquisadores verificaram que os peptídeos 2 e 3 estimularam células em cultura a produzir IL-1 $\beta$  e IL-10, citocinas pró e anti-inflamatórias, respectivamente, tendo o peptídeo 2 uma ação inflamatória intermediária quando comparada aos demais (Figura 4).



**Figura 4:** Dosagens de IL-1 $\beta$  e IL-10 após estímulos com os peptídeos. **A, B e C** - Dosagem de IL-1 $\beta$  após estímulos de diferentes concentrações dos peptídeos 1, 2 e 3, respectivamente. **D, E e F** - Dosagem de IL-10 após estímulos de diferentes concentrações dos peptídeos 1, 2 e 3, respectivamente.

Fonte: SILVA et al, 2015.

Tendo em vista tal observação, e considerando também sua maior disponibilidade para os experimentos futuros, optou-se por incluir o peptídeo 2 no presente projeto, em associação ao selante de fibrina

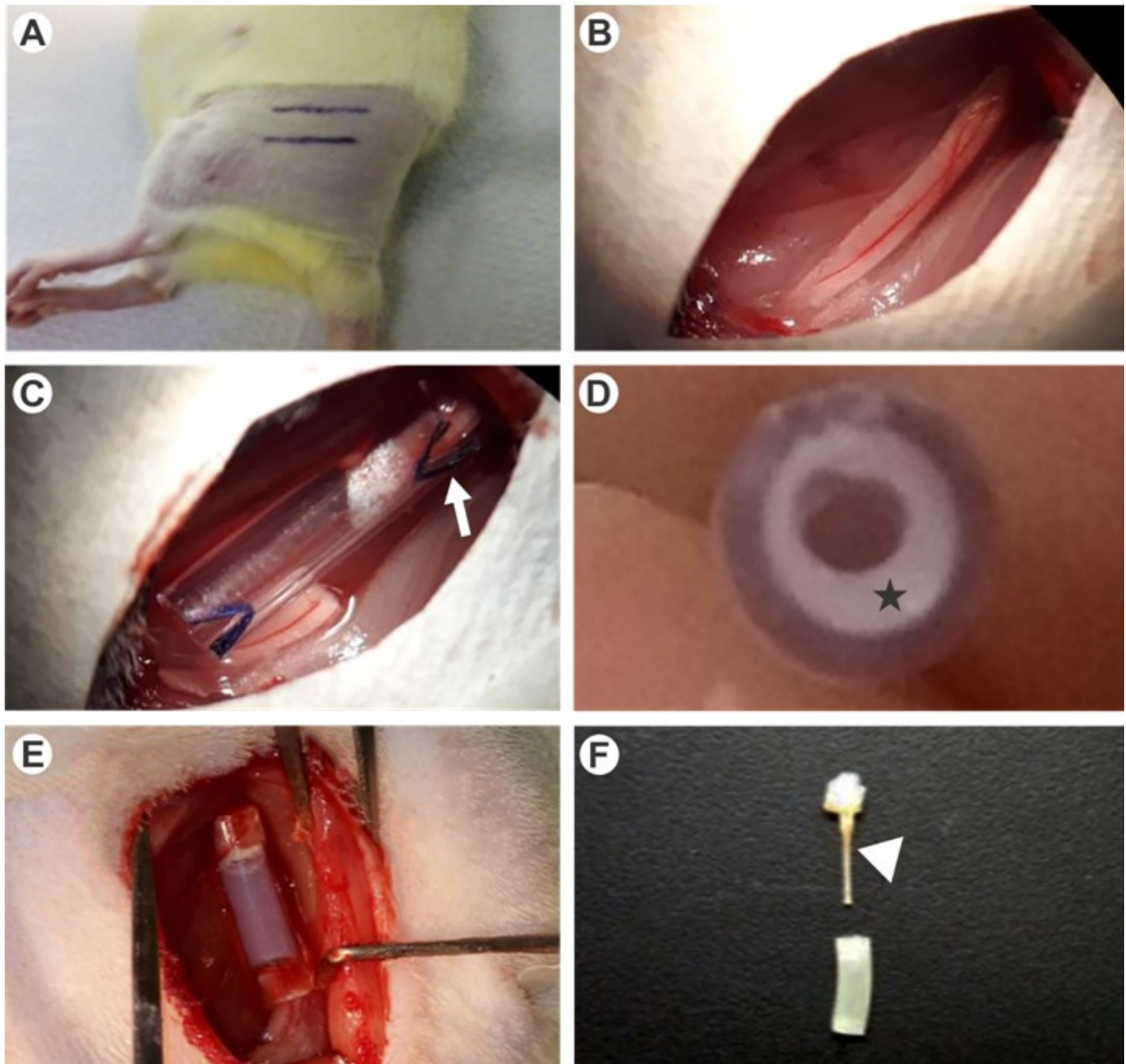
### 4.3. Procedimentos cirúrgicos para a tubulização

A tubulização foi realizada conforme protocolo descrito por Liang e colaboradores (2014), com algumas adaptações. A Figura 5 apresenta as etapas do procedimento.

Inicialmente, os animais foram anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilazina (15mg/kg) por via intraperitoneal. Uma vez confirmado o efeito da anestesia (ausência de movimentação de vibrícias e de movimentação com estimulação da pata), os animais foram submetidos à tricotomia da coxa esquerda e, então, colocados em decúbito lateral sobre o microscópio cirúrgico (Figura 5A). Realizada a incisão da pele, afastou-se a musculatura de forma a expor o nervo isquiático (Figura 5B), o qual em seguida sofreu transecção. Após a retração dos cotos, introduziu-se no local da lesão a prótese tubular de silicone com comprimento de 10 mm. A prótese foi posteriormente fixada aos cotos com cianoacrilato, deixando-se um espaço de 4 mm entre as extremidades no interior do tubo. Encerrados os procedimentos de tubulização, o plano muscular foi retornado e a pele fechada com pontos cirúrgicos (fio mononylon 6.0, Ethicon).

Tendo em vista que a adição do selante *BthTL* diminuiria o diâmetro interno das próteses tubulares utilizadas nos animais do grupo tubo vazio (diâmetro externo = 2,7mm), optamos por empregar tubos de maior diâmetro nos grupos tubo+cola e tubo+cola+pep (diâmetro externo = 3,3 mm em ambos os grupos). Assim, com a distribuição do selante ao redor das paredes das próteses tubulares de silicone (figura 5D), o diâmetro interno dos tubos do grupo tubo+cola e tubo+cola+pep ficou equivalente ao do grupo tubo vazio.

Por fim, os animais tiveram um período de sobrevida de 45 dias, durante os quais foram avaliados semanalmente para análise do retorno funcional do nervo. Após esse tempo, os animais foram eutanasiados para extração do nervo regenerado para estudo.



**Figura 5:** Etapas da cirurgia de tubulização. **A:** Animal colocado em decúbito lateral mostrando margem do fêmur (linha superior) e local da incisão (linha inferior). **B:** Nervo isquiático esquerdo. **C:** Coto proximal inserido em tubo vazio (seta). **D:** Vista superior da prótese tubular preenchida por selante de fibrina (estrela). **E:** Animal do grupo “tubo+cola”, com tubulização finalizada. **F:** Prótese tubular retirada de animal do grupo “tubo+cola” após 45 dias de sobrevida; destaca-se o segmento nervoso regenerado (cabeça de seta).

#### 4.4. Avaliações funcionais

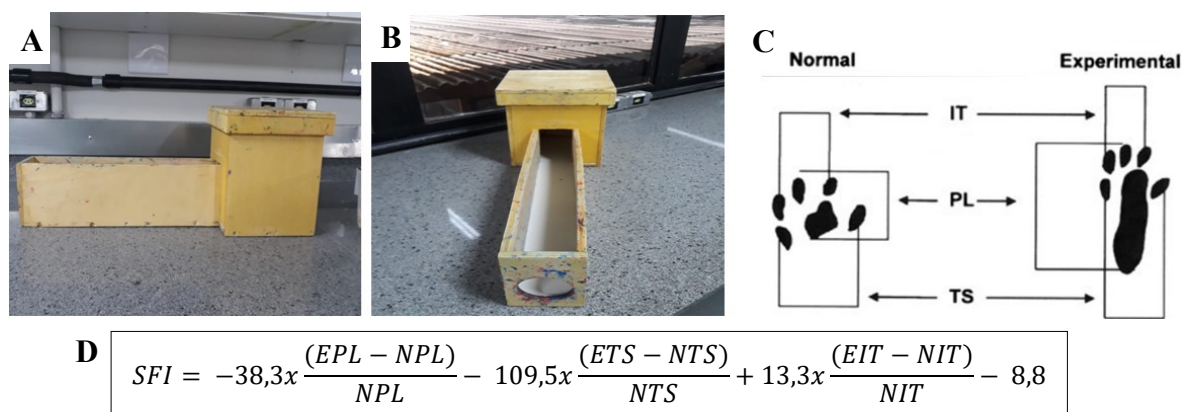
##### 4.4.1. Análise do índice funcional do isquiático (SFI)

A análise de Índice Funcional do Isquiático (SFI) foi realizada com base no protocolo descrito por Medinaceli e colaboradores (1984) e Inserra e colaboradores (1998), com adaptações propostas por Marcolino e colaboradores (2013). Para tanto, os animais

foram treinados uma semana antes da tubulização a caminhar no aparato construído para a análise funcional (Figura 6A e 6B), cujas dimensões são 23 cm x 21cm x 68 cm (Altura x Largura x Profundidade). Os animais tiveram suas patas posteriores pintadas com tinta atóxica, o que possibilitou a coleta da impressão plantar através da caminhada sobre tira de papel colocada no corredor da caixa de avaliação. As análises foram realizadas três dias antes da cirurgia e, após o procedimento cirúrgico, uma vez por semana até cessar o período de sobrevida. Os dados de cada animal foram identificados individualmente, de modo a permitir seu acompanhamento ao longo do tempo.

As tiras de papel contendo as impressões plantares foram, posteriormente, digitalizadas e analisadas por meio do *software* ImageJ 1.48V. Os parâmetros medidos nas impressões (Figura 6C), tanto das patas normais como das patas comprometidas, foram o comprimento da pegada (PL, “*print length*”), a abertura total dos dedos (TS, “*toe spread*”) e abertura dos dedos intermediários (IT, “*intermediate toes*”). Essas medidas foram, então, inseridas na fórmula do cálculo do SFI (Figura 6D).

A pontuação obtida anteriormente ao procedimento cirúrgico foi considerada função normal, correspondendo, portanto, à integridade do nervo. As demais pontuações obtidas durante o período de sobrevida foram expressas como porcentagens relativas à pontuação inicial.



**Figura 6:** Aparato e cálculo utilizados para o SFI. **A e B:** Aparato utilizado para o teste motor. **C:** Esquema das medidas realizadas após obtenção da impressão plantar das patas normal e lesionada. **D:** Fórmula do índice funcional do isquiático (SFI). EPL: comprimento da pegada no lado lesionado. NPL: comprimento da pegada no lado normal. ETS: abertura total dos dedos no lado lesionado. NTS: abertura total dos dedos no lado normal. EIT: abertura dos dedos intermediários no lado lesionado. NIT: abertura dos dedos intermediários no lado normal.

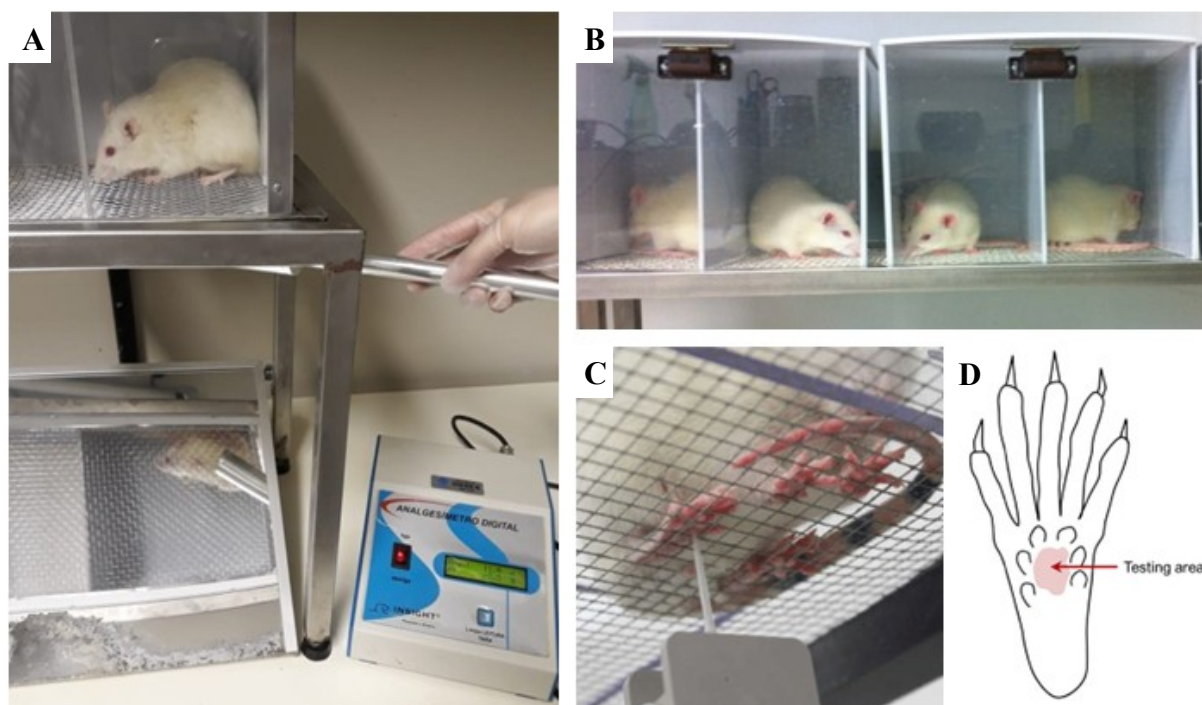
Fonte: imagens 4C e 4D - MARCOLINO et al, 2013.



#### 4.4.2. Análise da sensibilidade – Teste de pressão crescente (Von Frey eletrônico)

A avaliação da hipernocicepção mecânica na pata dos animais foi feita por meio do teste de pressão crescente descrito por Möller e colaboradores (1998). Tal teste foi realizado em um aparelho composto por uma ponteira 10  $\mu$ L (T-300, Axygen) que estimula a pata do animal. A ponteira é adaptada a um transdutor de pressão que, por sua vez, é ligado a um detector digital de força, expressa em gramas (Figura 7A). No teste, a ponteira é aplicada em ângulo reto na região central da pata traseira do animal (Figuras 7C e 7D), com pressão gradualmente crescente, até provocar uma resposta de flexão característica (retirada da pata seguida de sacudidas da mesma), quando o estímulo é interrompido. A intensidade de hipernocicepção (hiperalgesia) foi quantificada pela variação na pressão (delta de reação em gramas), obtida subtraindo-se o valor observado antes da tubulização do valor após o procedimento.

As análises da sensibilidade foram realizadas uma semana antes da cirurgia e, após o procedimento cirúrgico, uma vez por semana até cessar o período de sobrevida.



**Figura 7:** Teste de pressão crescente (Von Frey eletrônico). **A:** Visão geral do aparelho onde se realiza o Von Frey eletrônico. **B:** Gaiola em que os animais ficaram alocados durante o teste; evidencia-se em **C** o assoalho espaçado de arame da gaiola, o que permite o contato da ponteira à pata traseira. **D:** Esquema do local correto na pata do animal em que se deve realizar a pressão de maneira crescente.

#### 4.5. Imunofluorescência

Após 45 dias de sobrevivência, 5 animais de cada grupo foram conduzidos para a imunofluorescência. Para tanto, esses animais foram anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilazina (15mg/kg), via intraperitoneal, sendo em seguida submetidos à toracotomia e perfundidos transcárdicamente, primeiramente, com solução salina (visando lavagem tecidual) e, após, com solução paraformaldeído 4% em PBS 0,1M, pH 7,4 (visando fixação do tecido).

Realizada a perfusão, o conjunto contendo o nervo regenerado no interior da prótese foi imerso em solução paraformaldeído 4% em PBS 0,1M, pH 7,4 por 12 horas a 4°C. Passado esse período, o conjunto foi lavado em PBS 0,1M, pH 7,4 e dissecado sob lupa, retirando-se o segmento regenerado do interior do tubo. Os nervos regenerados, de forma individual, foram novamente imersos em solução paraformaldeído 4% em PBS 0,1M, pH 7,4 por 12 horas e, depois, foram colocados individualmente em frascos contendo solução de sacarose 20% em PBS 0,1M, pH 7,4 por 12 horas, sendo por fim imersos em tissue-tek (Milles Inc., USA) e congelados em n-hexano (-40°C; Merk) resfriado em nitrogênio líquido. Posteriormente, cortes congelados com 12µm de espessura foram obtidos em criostato (Leica) e as secções foram transferidas para lâminas silanizadas e estocadas a -20°C até o momento da realização das imunomarcações

Para as imunomarcações, as lâminas foram, primeiramente, lavadas em PBS 0,1M, pH 7,4 após atingirem a temperatura ambiente (três lavagens de cinco minutos cada). Foi feito, em seguida, o bloqueio de reações inespecíficas por meio da incubação em solução de albumina sérica bovina (BSA) 5% em PBS 0,1M, pH 7,4 por 1 hora. Foram realizadas, então, três lavagens em PBS 0,1M, pH 7,4 (cinco minutos para cada lavagem) e, em seguida, os anticorpos primários (Tabela 2) foram aplicados e incubados *overnight* a 4°C. Na sequência, realizou-se lavagens em PBS 0,1M, pH 7,4 (três lavagens de cinco minutos cada) e os respectivos anticorpos secundários conjugados com Alexa-fluor 594 ou 488 nm foram incubados por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram, então, lavadas em PBS 0,1M, pH 7,4, (três lavagens de cinco minutos cada), montadas em PBS/glicerol (3:1) e observadas em microscópio de fluorescência Nikon Ti-S. Foram capturadas com câmera digital Opticam duas imagens de cada um dos segmentos nervosos, de forma padronizada para todos os nervos. As imagens foram analisadas no *software* ImageJ para a quantificação da densidade de pixels em seis áreas de diferentes regiões de cada um dos campos

fotografados. Foram calculadas as médias aritméticas de cada grupo e essas comparadas entre si.

**Tabela 2:** Anticorpos primários utilizados no presente trabalho e sua respectiva marcação

<b>Anticorpo</b>	<b>Marcação</b>
Camundongo anti-neurofilamento (1:350, Sigma)	Citoesqueleto de axônios
Coelho anti-S100 $\beta$ (1:400, Santa Cruz)	Receptor cálcio-dependente presente em células de Schwann
Policlonal de coelho para p75 do receptor de NGF (1:100, Abcam)	Proteína Anti-NGF do receptor p75, responsável por mediar a sobrevivência e a morte celular em células neuronais
Policlonal de coelho para anti-GAP-43 (1:200, Abcam)	Cones de crescimento neuronal durante o desenvolvimento e regeneração do axônio.
Camundongo anti-Iba (1:300, Santa Cruz)	Proteína de ligação a cálcio específica de macrófagos e microglia

#### **4.6. Análise histopatológica e de colágeno**

Lâminas contendo secções longitudinais dos segmentos nervosos foram coradas com hematoxilina de Harris e eosina e entregues a uma patologista externa ao trabalho (e, portanto, “cega” ao delineamento experimental) para análise histopatológica. A especialista observou e fotografou as imagens em microscópio Leica modelo DM500 acoplado a uma câmera HD ICC 50 por meio do *software* LEICA LAS EZ (v1.8.1, Leica Microsystems Limited, Suíça). Ao final da análise, a especialista confeccionou um laudo (anexo B) com suas conclusões.

Outras lâminas contendo secções longitudinais dos nervos foram coradas com picrosirius red a fim de identificar colágenos tipo I (vermelho) e III (verde) presentes nas amostras sob luz polarizada. O material foi observado em microscópio Nikon Ti-S com filtro de polarização e duas imagens de cada um dos segmentos nervosos foram obtidas com câmera digital Opticam, de forma padronizada para todos os nervos. As imagens foram analisadas no *software* ImageJ para a quantificação da densidade de pixels em três áreas de diferentes regiões de cada um dos campos fotografados. Foram calculadas as médias aritméticas de cada grupo e essas comparadas entre si.

#### **4.7. Microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Após 45 dias da cirurgia, os animais para MET foram anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilazina (15mg/kg), via intraperitoneal, sendo em seguida submetidos à toracotomia e perfundidos transcardiacamente com solução salina tamponada (NaCl 0,9% em PBS 0,1M, pH 7,4) e, em seguida, com fixador Karnovsky (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2). Realizada a perfusão, conjunto contendo o nervo regenerado no interior da prótese foi dissecado e imerso em fixador Karnovsky por 12 horas a 4°C. Passado esse período, o conjunto foi lavado em PBS 0,1M, pH 7,4 e dissecado sob lupa, retirando-se o segmento regenerado do interior do tubo. Os nervos regenerados, de forma individual, foram colocados novamente em solução Karnovsky por 12 horas a 4°C e, em seguida, cada nervo regenerado foi cortado na metade (corte transversal), permanecendo um fragmento proximal e um distal, que foram separados. Os fragmentos, então, foram colocados individualmente em frascos contendo PBS 0,1M, pH 7,4 e, em seguida, foram submetidos à pós-fixação em solução tetróxido de ósmio 1% diluído em PBS 0,2M, pH 7,4 por 2 horas. Após a pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada, desidratados em séries crescentes de acetona e incluídos em resina (Epon 812, EMS) em moldes de silicone que foram para estufa a 60°C por 72 horas para polimerização da resina. Dos blocos resultantes, somente os de fragmentos distais de nervo regenerado foram desbastados e as secções semifinas (0,5µm) obtidas e coradas com azul de toluidina 0,25% para a observação e documentação em microscópio óptico LEICA modelo DM500 acoplado a uma câmera HD ICC 50, via *software* LEICA LAS EZ (v1.8.1, Leica Microsystems Limited, Suíça). Realizou-se, em seguida, cortes ultrafinos (500Å; Ultramicrótomo LKB, Bromma 8800) que foram coletados em telas de cobre 200 *Mesh*. Após contraste em acetato de uranila e citrato de chumbo, os espécimes foram observados e fotografados no microscópio eletrônico Hitachi HT7700, operando a 60kv.

#### **4.8. Morfometria e contagem das fibras regeneradas**

A morfometria e as contagens de fibras mielínicas e degeneradas foram feitas em secções semifinas coradas com azul de toluidina observadas em microscopia de luz. A contagem de fibras amielínicas foi realizada nas secções ultrafinas observadas em microscopia eletrônica de transmissão.

Foram considerados os seguintes parâmetros para a análise morfométrica: diâmetro das fibras mielínicas (DFM), diâmetro dos axônios mielínicos (DAM), espessura da bainha de mielina (EBM) e razão "g" (RZG) ( $RZG = DAM/DFM$ ). O estudo do comportamento das CS, em particular, foi realizado a partir dos valores da EBM e da RZG. A EBM é obtida a partir da diferença entre o DFM e o DAM (MAYHEW E SHARMA, 1984) e indica, de maneira direta, o nível de atividade fisiológica das CS durante a regeneração, estando também relacionada à recuperação funcional do nervo e tendo sido utilizada na avaliação da evolução do processo regenerativo axonal por diversos autores (LUNDBORG et al, 1982; OLIVEIRA E LANGONE, 2000). A RZG corresponde ao quociente entre DAM e DFM; trata-se de um parâmetro morfométrico que expressa a relação que se estabelece entre a CS e o axônio durante a regeneração do nervo (SMITH E KOLES, 1970; WAXMAN, 1980). Os diâmetros (DAM e DFM) foram obtidos a partir dos valores dos perímetros (P) do axônio e da fibra, respectivamente, aplicando-se a fórmula  $Diâmetro = P/\pi$ . A morfometria foi realizada empregando-se o *software* ImageJ.

Para a morfometria e para as contagens de axônios mielínicos ou degenerados, cinco campos representativos de cada nervo regenerado foram obtidos por meio do microscópio óptico LEICA modelo DM500 acoplado a uma câmera HD ICC 50, em objetiva de 100x. As imagens dos cortes semifinos foram capturadas por meio do *software* LEICA LAS EZ (v1.8.1, Leica Microsystems Limited, Suíça). O número de fibras foi contado em uma área de  $1.000 \mu m^2$  do nervo regenerado. As secções ultrafinas tiveram 25 campos documentados num aumento de 4.000x. Nessas imagens foi quantificado o número de axônios amielínicos, sendo calculada a média para cada animal e, posteriormente, a média do grupo, as quais foram comparadas. Para axônios amielínicos também se considerou uma área de  $1.000 \mu m^2$ .

#### **4.8. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism 5.0. Foi executado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov a fim de verificar o tipo de distribuição de dados. Para dados paramétricos, utilizou-se o teste ANOVA *one way* com pós-teste de Newman-Keuls. Já para dados não paramétricos, utilizou-se o teste *U* de Mann-Whitney. Em todos os testes foi considerado nível de significância  $p < 0,05$ . Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão, sendo \*\*\* indicativo de  $p < 0,001$ , \*\* indicativo de  $p < 0,01$  e \* indicativo de  $p < 0,05$ .

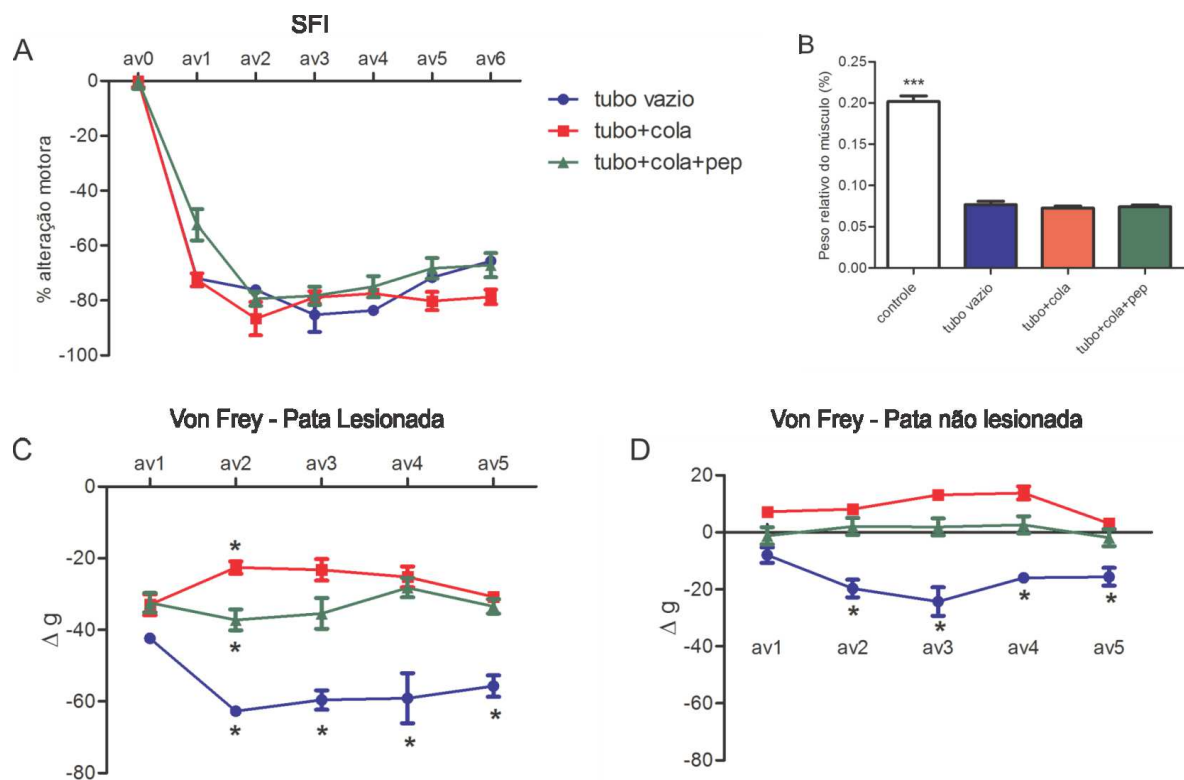
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Ausência de recuperação motora e sensitiva nos três grupos experimentais

Na semana seguinte e duas semanas após a execução do procedimento de tubulização iniciaram-se as análises motora e sensitiva, respectivamente, a fim de acompanhar e estimar a porcentagem de recuperação do nervo lesionado. A análise sensitiva foi iniciada após duas semanas porque, por recomendações do CEUA, na primeira semana pós-cirúrgica todos os animais foram medicados com cloridrato de tramadol (10 mg/kg, via oral) para analgesia; nessa situação, a avaliação da sensibilidade/dor ficaria comprometida. Tanto a análise sensitiva quanto a motora foram feitas uma vez por semana até cessar o período de sobrevivência. Optou-se por realizar as técnicas em dias diferentes da semana a fim de evitar desconforto excessivo aos animais.

Os resultados obtidos do SFI (Figura 8A) e as medidas do Von Frey eletrônico (Figuras 8C e 8D) não evidenciam recuperação motora ou sensitiva dos animais dos três grupos. A análise do SFI mostrou que os grupos apresentaram valores bem abaixo daquele obtido antes do procedimento cirúrgico (av0), onde se considera integridade de função, em comparação às demais avaliações. A análise do peso relativo dos músculos tibiais anteriores (figura 8B), expresso em porcentagem, indicou grande atrofia muscular após lesão nos animais dos três grupos, confirmando a falta de reinervação.

Com relação às medidas do Von Frey eletrônico, vimos que o grupo tubo vazio apresentou maior limiar de nocicepção em ambas as patas, isto é, esses animais precisaram receber mais carga para realizar o reflexo de retirada da pata em comparação aos outros grupos, com diferenças significantes apontadas pelos asteriscos nos gráficos. Essas observações indicam que os grupos contendo selante sentiram a pressão aplicada com menos carga, mostrando, portanto, maior sensibilidade na pata lesionada e também na pata normal. No entanto, nenhum dos grupos apresentou uma curva ascendente do teste de Von Frey, o que traduz ausência de mudança da sensibilidade em relação ao tempo após a lesão nervosa.



**Figura 8:** Avaliações funcionais e peso relativo do músculo tibial anterior. **A:** SFI. Zero (0) indica a função do nervo íntegro. As demais avaliações (av) foram realizadas semanalmente durante o período de sobrevida dos animais dos grupos tubo vazio (linha azul), tubo+cola (linha vermelha) e tubo+cola+pep (linha verde). Não houve diferença nas avaliações motoras em nenhum dos três grupos durante todo o período de sobrevida. Teste ANOVA *one way* com pós-teste de Newman-Keuls. (\* =  $p < 0,05$ ). **B:** Peso relativo do músculo tibial anterior de animais com o nervo isquiático íntegro (controle – barra branca) e dos grupos tubo vazio, tubo+cola e tubo+cola+pep (barras azul, vermelha e verde, respectivamente). Observa-se grande atrofia muscular em todos os grupos quando comparados ao controle. Teste ANOVA *one way* com pós-teste de Newman-Keuls (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ). **C e D:** Medidas do Von Frey eletrônico para as patas lesionada e não lesionada, respectivamente. Em ambas as patas, o grupo tubo vazio apresentou limiar nociceptivo significativamente maior quando comparados aos demais. Grupo tubo+cola (linha vermelha) apresentou menor limiar de nocicepção quando comparado ao tubo vazio (linha azul) e ao tubo+cola+pep (linha verde). Teste ANOVA *one way* com pós-teste de Newman-Keuls. (\* =  $p < 0,05$ ).

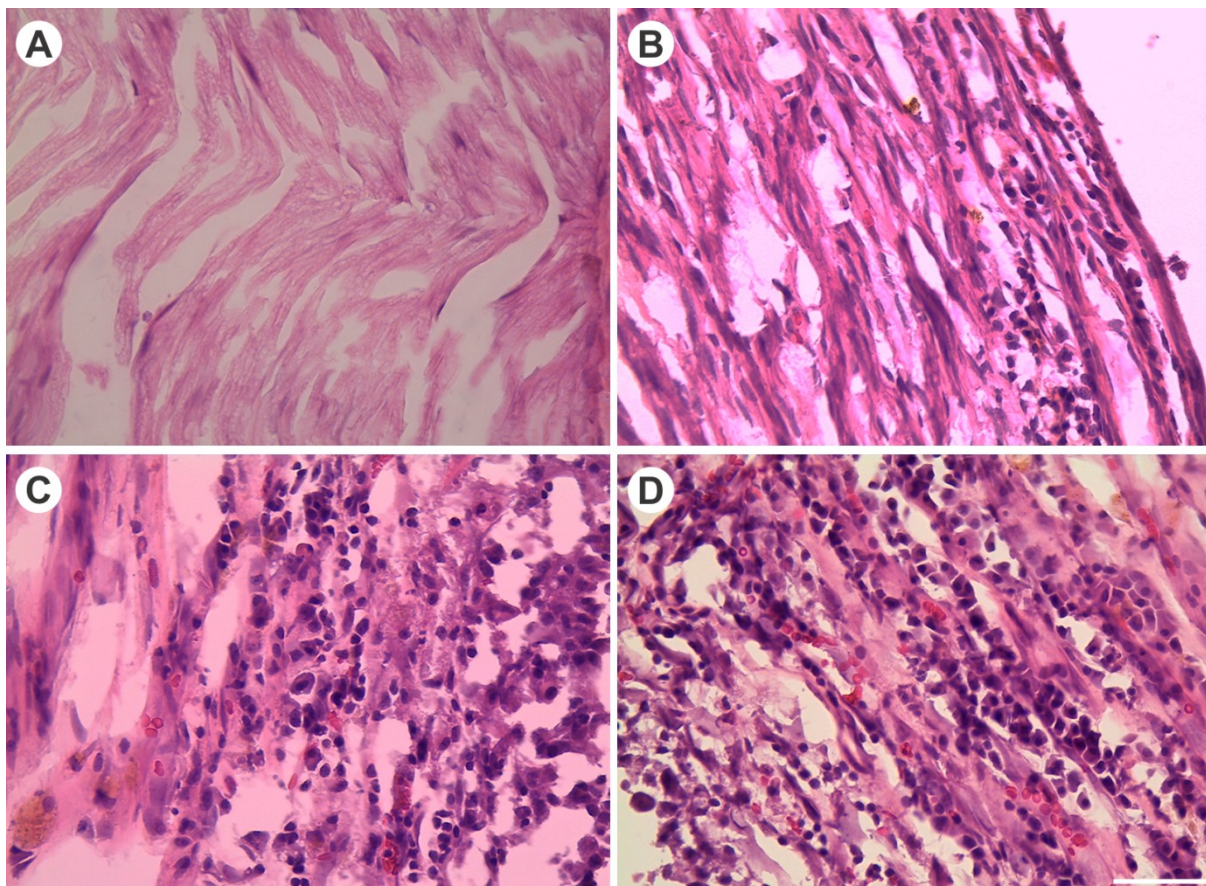
## 5.2. Intenso infiltrado inflamatório na presença do selante *BthTL* em associação ao peptídeo de ação mimética ao TNF

Secções longitudinais de nervos íntegros e de segmentos regenerados dos três grupos foram coradas com Hematoxilina e Eosina e, posteriormente, analisadas por uma patologista (Figura 9, laudo: anexo B).

Com relação ao grau de inflamação, verificou-se intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário ao longo de todo segmento de nervos do grupo tubo+cola+pep. Inúmeros macrófagos (dado confirmado pela imunofluorescência – próximo item), plasmócitos e linfócitos foram observados próximo ao epineuro e invadindo a área das fibras nervosas. A



análise dos nervos dos grupos tubo vazio e tubo+cola revelaram leve e moderado, infiltrado linfoplasmocitário, respectivamente. Em ambos os grupos, observou-se inúmeros macrófagos, plasmócitos e linfócitos. Porém, a população de células imunes não estava invadindo as áreas das fibras nervosas.



**Figura 9:** Cortes longitudinais de nervos corados com HE. A: nervo íntegro. B: tubo vazio. C: tubo+cola. D: tubo+cola+pep. Escala = 50  $\mu$ m.

### 5.3 Maior expressão de NGFRp75 em nervos regenerados do grupo selante *BthTL* associado ao peptídeo de ação mimética ao TNF

Foram realizadas imunomarcações (Figura 10A-L) para análise de macrófagos (Iba-1), da atividade (S100  $\beta$ ) e fenótipo pró-regenerativos (NGFRp75) das CS. As médias dos grupos foram plotadas em gráfico de barras e comparadas estatisticamente (Figura 10, linha inferior). A análise das imunomarcações para Iba-1 mostra maior presença de macrófagos nos nervos regenerados quando comparados ao nervo íntegro. Entre os três grupos, aquele que mostrou maior quantidade de Iba-1 foi o grupo tubo+cola+pep, concordando com dados da

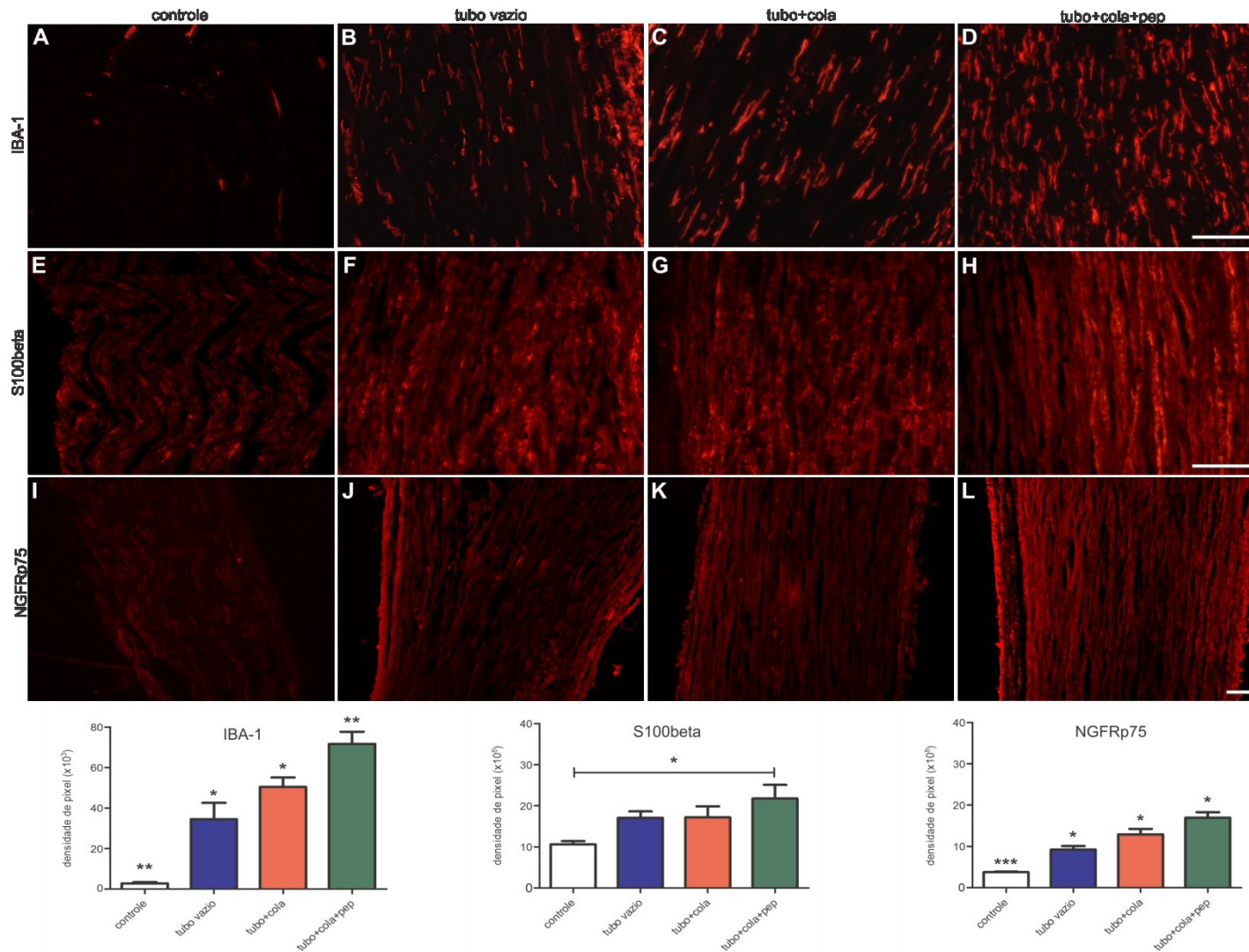


análise histopatológica, seguido pelo grupo tubo+cola e tubo vazio, respectivamente. As CS mostraram uma atividade mais elevada no grupo tubo+cola+pep, com maior expressão de S100 $\beta$  em relação ao nervo íntegro. Este, também, foi o grupo que apresentou maior expressão de NGFRp75, indicando CS trabalhando em favor da regeneração do nervo.

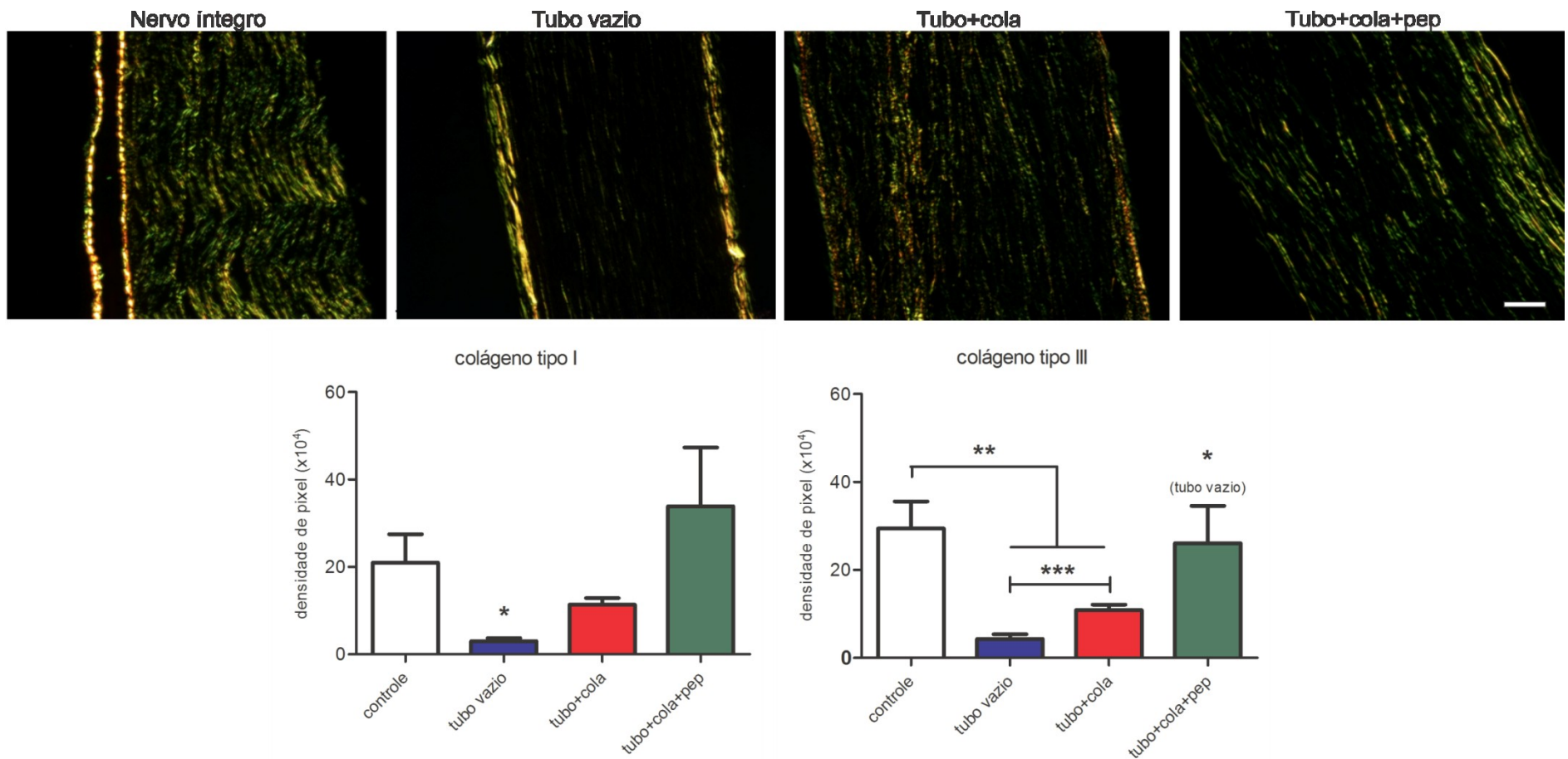
#### **5.4. Deposição de colágeno tipo III semelhante aos nervos íntegros no grupo tubo+cola+pep**

Foi realizada coloração com picosirius *red* em cortes longitudinais de nervos íntegros e de segmentos regenerados dos três grupos a fim de evidenciar a deposição de colágenos tipos I e III. A coloração é observada em microscópio de luz polarizada (Figura 11), sendo o colágeno tipo I correspondente à cor vermelha e o colágeno tipo III à cor verde. Se ambos os tipos de colágeno tiverem deposição concomitante em um mesmo local, isto é, em caso de sobreposição dos dois tipos de colágeno, esta é vista na cor amarela.

O grupo tubo vazio apresentou deposição de colágeno tipo I significativamente menor em comparação aos demais, que não apresentaram diferenças entre si. Quanto à deposição de colágeno tipo III, não foi vista diferença entre o grupo tubo+cola+pep e nervos íntegros. Ambos apresentaram maior deposição deste tipo de colágeno em comparação aos grupos tubo vazio e tubo+cola, cuja deposição foi maior que a do tubo vazio.



**Figura 10:** Cortes longitudinais com imunomarcações anti Iba-1 (A-D), S100 $\beta$  (E-H) e NGFRp75 (I-L) em nervos íntegros (controle - barra branca) e regenerados (tubo vazio - barra azul; tubo+cola - barra vermelha, tubo+cola+pep - barra verde). Gráficos (**linha inferior**) mostrando média, erro padrão e comparação estatística entre os grupos. Teste ANOVA *one way* com pós-teste de Newman-Keuls. \*\*\* =  $p < 0,001$  e \* =  $p < 0,05$ . Escala = 100  $\mu$ m.



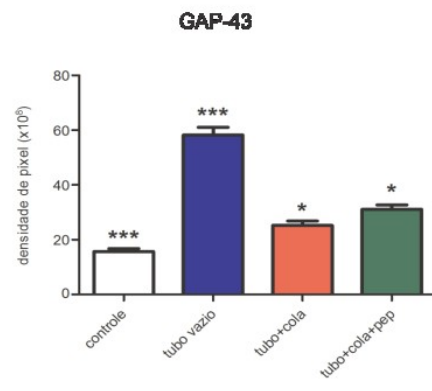
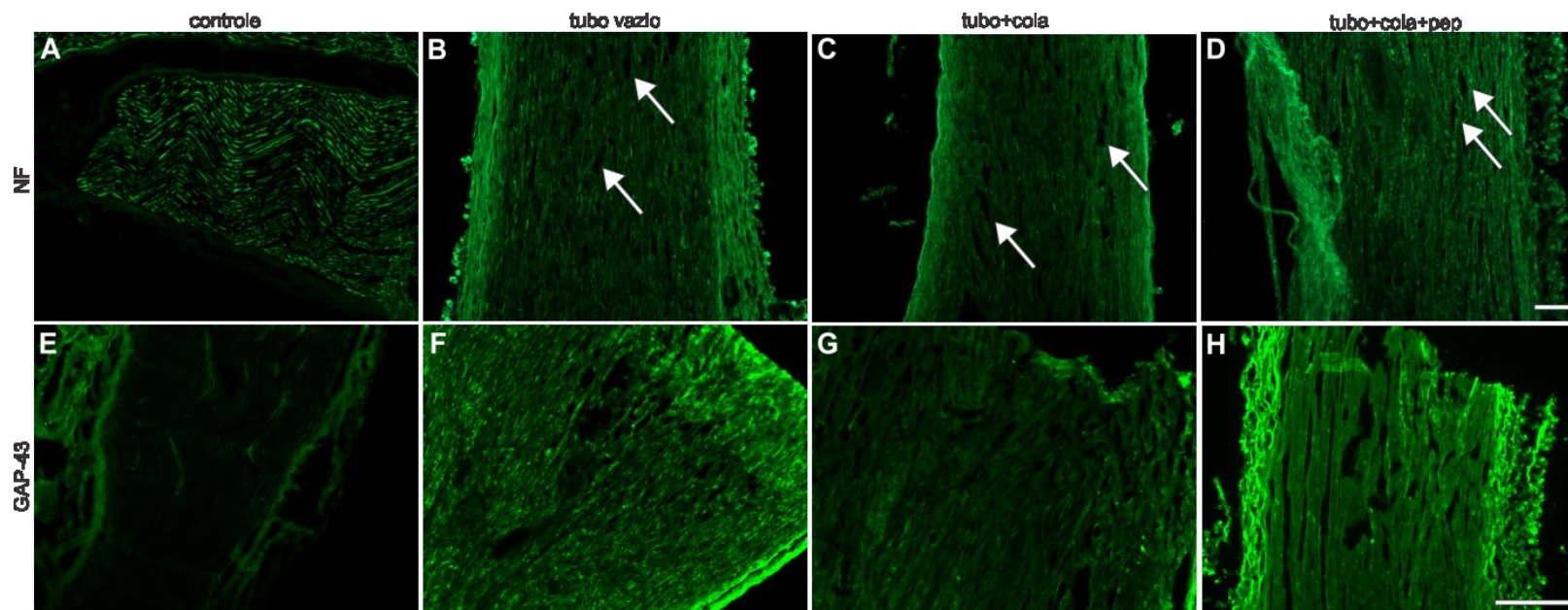
**Figura 11:** Cortes longitudinais corados com picrosirius red. **A:** nervo íntegro. **B:** tubo vazio. **C:** tubo+cola. **D:** tubo+cola+pep. **Linha inferior:** Gráficos mostrando média $\pm$ ep dos grupos: controle - barra branca, grupo tubo vazio-barra azul, tubo+cola- barra vermelha e tubo+cola+pep- barra verde. Teste ANOVA *one way* com pós-teste de Newman-Keuls (\*\* = p<0,001, \*\* = p<0,01 e \* = p<0,05). Escala = 100 $\mu$ m.

### **5.5. Maior expressão de GAP-43 em nervos regenerados do grupo tubo vazio**

Tendo em vista a ausência de recuperação funcional nos diferentes grupos, buscamos avaliar a disposição dos axônios no nervo (neurofilamento) e o crescimento dos mesmos (GAP-43).

No nervo íntegro normalmente observa-se axônios em zigue-zague (Figura 12A), enquanto que após a lesão os axônios começam a crescer em linha reta dentro das bandas de Büngner (Figura 12B-D). Nesse contexto, na imunomarcação anti-neurofilamento realizou-se uma análise qualitativa comparativa em que o aspecto observado é a presença de alinhamento e espaços entre os axônios. Dessa forma, a organiza o do citoesqueleto axonal em todos os grupos se deu em um arranjo reto e de maneira semelhante, com alguns espaços que parecem “quebras” das linhas (setas).

Quanto   proteína GAP-43 (Figura 12E-H), observamos aumento de sua expressão em todos os grupos com nervo regenerado quando comparados ao nervo íntegro. Ao analisarmos as imunomarca es nos segmentos regenerados em cada um dos tubos, notamos aproximadamente o triplo de expressão em nervos do grupo tubo vazio. Portanto, maior presença de cones de crescimento em seus axônios.



**Figura 12:** Cortes longitudinais com imunomarcações anti neurofilamento (A-D) e anti-GAP-43 (E-H) em nervos íntegros (controle-barra branca) e regenerados (tubo vazio-barra azul, tubo+cola- barra vermelha, tubo+cola+pep - barra verde). Setas indicam espaços entre axônios em crescimento. Gráfico (linha inferior) mostrando média, erro padrão e comparação estatística entre os grupos para a expressão de GAP-43. Teste ANOVA *one way* com pós-teste de Newman-Keuls. \*\*\* =  $p < 0,001$  e \* =  $p < 0,05$ . Escala = 100  $\mu$ m.

## **5.6. Nervos regenerados do grupo tubo+cola apresentaram o dobro da quantidade de fibras degeneradas e menor quantidade de fibras amielínicas. A associação do selante ao peptídeo de ação mimética ao TNF proporciona maior DFM, EBM e RZG**

Por meio de cortes semifinos (Figura 13) e pela a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, foram realizadas as contagens de fibras mielínicas, degeneradas (Figuras 14A e B, respectivamente) e amielínicas (Figura 15) em nervos isquiáticos íntegros e regenerados nos três grupos. Adicionalmente, foi realizada análise morfométrica (Tabelas 3 e 4) para mensurar os diâmetros dos axônios e de fibras mielínicas, usados para o cálculo da espessura da bainha de mielina e da razão g. Outras medidas realizadas foram as áreas da secção transversal dos nervos e dos epineuros (Figura 14C e D).

Houve maior quantidade de fibras mielínicas nos três grupos de nervos regenerados em comparação aos nervos íntegros. Dentre os nervos regenerados, o grupo tubo vazio apresentou maior quantidade de fibras mielínicas que os demais, e não houve diferença entre os grupos tubo+cola e tubo+cola+pep (Figura 14A).

Quanto à contagem de fibras degeneradas e amielínicas (Figuras 14B e 15, respectivamente), nervos provenientes do grupo tubo+cola foram os únicos diferentes, com maior quantidade de fibras degeneradas (aproximadamente o dobro dos outros grupos) e menor quantidade de fibras amielínicas (aproximadamente a metade dos demais) nos segmentos regenerados. Nervos íntegros e segmentos regenerados provenientes dos grupos tubo vazio e tubo+cola+pep apresentaram contagem semelhante de fibras degeneradas e amielínicas.

Na análise morfométrica, observou-se que o DFM em nervos regenerados dos três grupos ficou abaixo daquele visto para nervos íntegros. Não houve diferença entre os DFM dos grupos tubo vazio e tubo+cola. Vimos, entretanto, fibras mielínicas de diâmetro significativamente maior no grupo tubo+cola+pep quando comparados aos demais (Tabelas 3 e 4). Com relação ao DAM, por outro lado, não foram vistas diferenças entre os três grupos, somente diferenças significativas em relação ao nervo íntegro, o que era esperado (Tabelas 3 e 4). Os nervos íntegros normalmente apresentam também uma EBM mais espessa, como foi visto aqui. Comparando-se os três grupos com nervo regenerado, não houve diferença nos valores de EBM dos grupos tubo vazio e tubo+cola, porém, a EBM do grupo tubo+cola+pep foi significativamente maior (Tabelas 3 e 4).



Com relação à RZG, não foi observada diferença entre nervos íntegros e segmentos regenerados do grupo tubo+cola+pep (Tabelas 3 e 4). Tendo em vista que a RZG é dada pela relação entre DAM e DFM e que é um indicativo do grau de mielinização, pode-se inferir que, nesses tubos, as fibras regeneradas alcançaram mielinização semelhante àquela vista em um nervo não lesionado. Nos demais grupos, por outro lado, a RZG teve valor superior quando comparada aos segmentos íntegros, o que é indicativo de remielinização ainda imatura, com mielina pouco espessa para o tamanho do axônio.

Por fim, não vimos diferença entre as áreas de secção transversal de nervos íntegros quando comparados os três grupos de nervos regenerados, nem na espessura de seus epineuros (Figura 14D e E).

**Tabela 3:** Análise morfométrica (Médias ± Erro padrão)

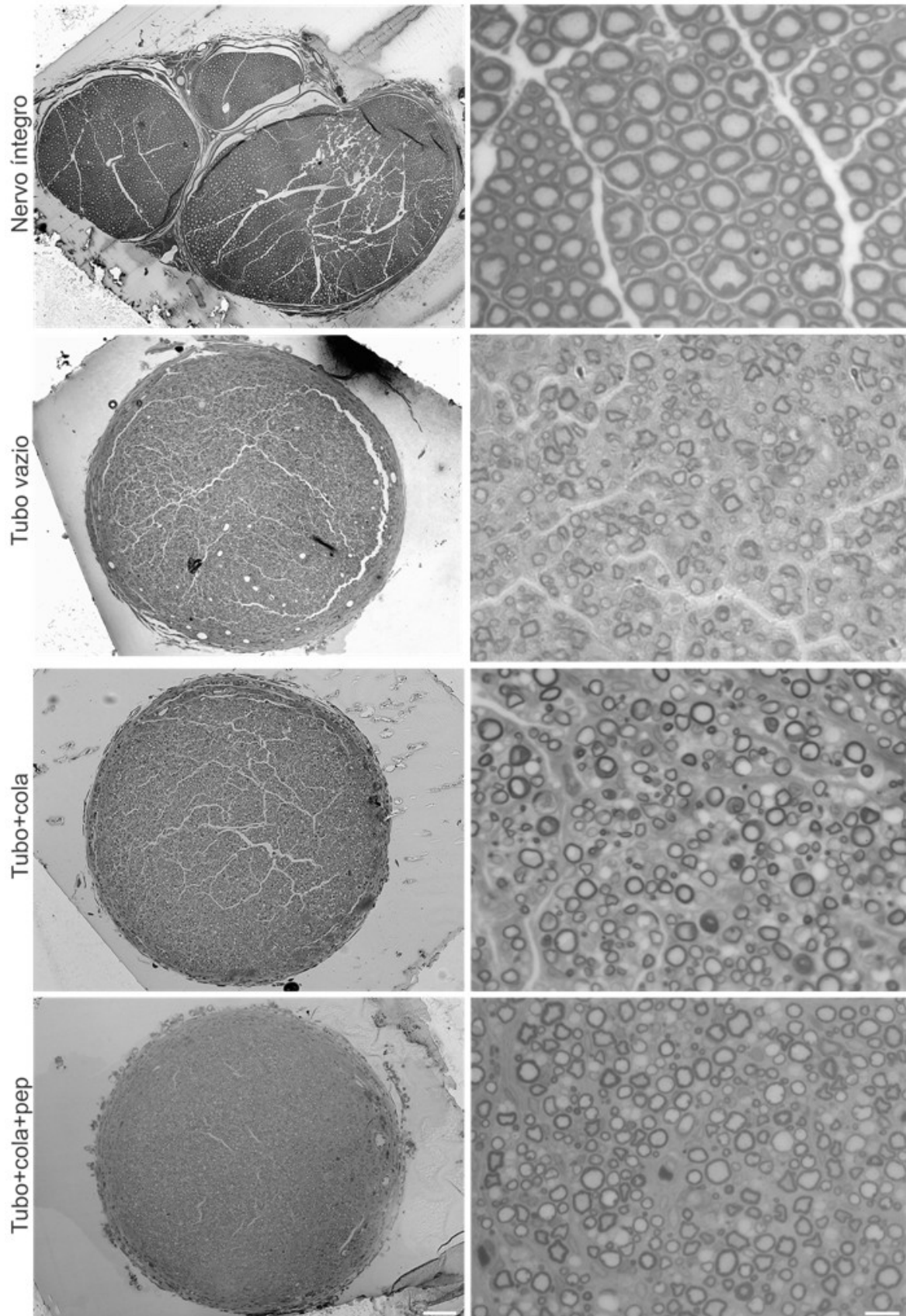
Grupos	DFM (µm)	DAM(µm)	EBM(µm)	Razão-g
Normal	10,99±0,25	6,91±0,19	2,04±0,07	0,63±0,01
Tubo vazio	5,67±0,13	3,92±0,12	0,88±0,02	0,69±0,01
Tubo+cola	5,89±0,15	4,22±0,12	0,84±0,02	0,72±<0,01
Tubo+cola+pep	6,70±0,14	4,38±0,13	1,16±0,03	0,65±0,01

DFM: diâmetro de fibras mielínicas. DAM: diâmetro de axônios mielínicos. EBM: espessura da bainha de mielina.

**Tabela 4:** Tratamento estatístico dos dados morfométricos

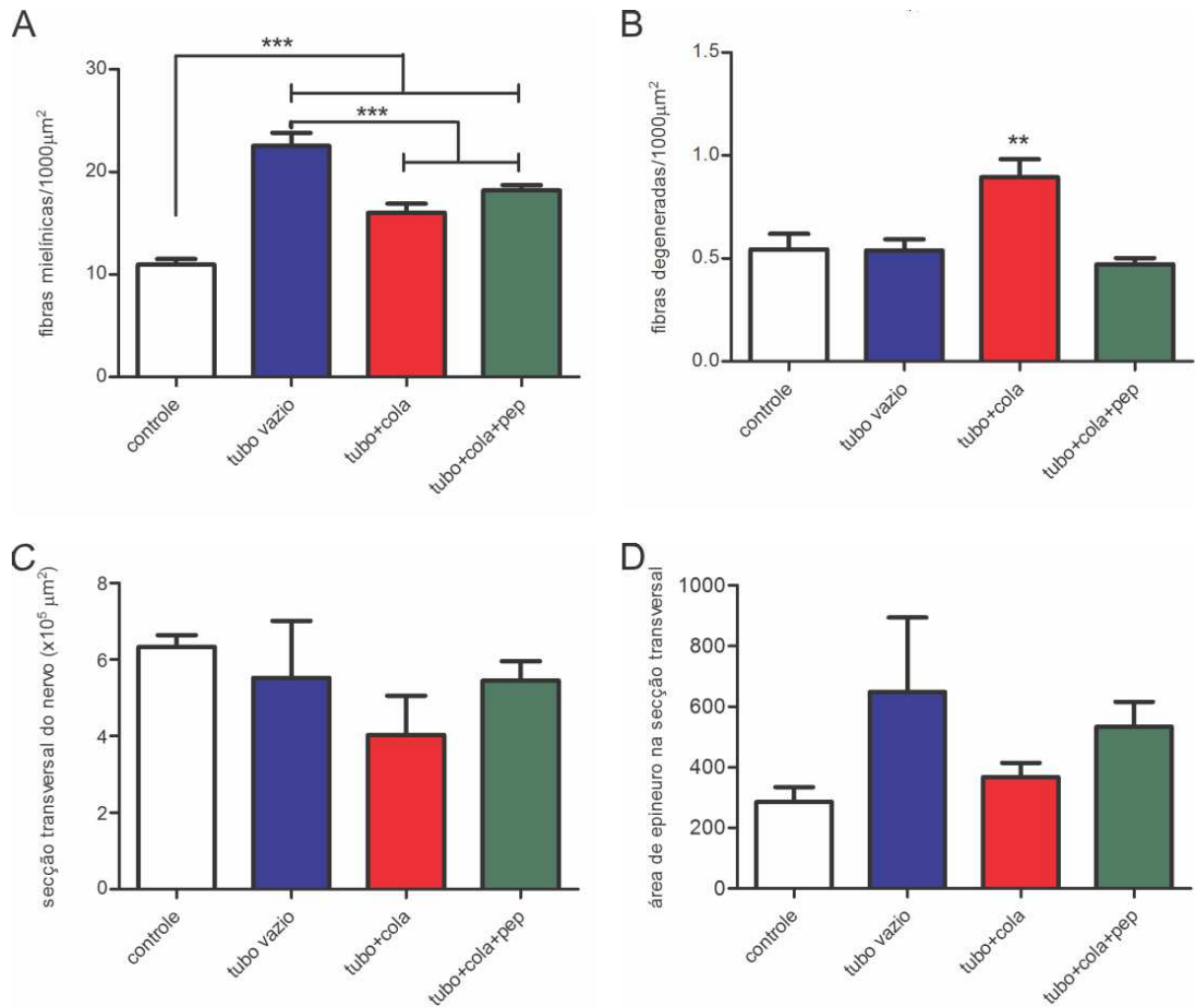
Grupos	DFM	DAM	EBM	Razão-g
Normal VS Tubo vazio	***	***	***	***
Normal VS Tubo+cola	***	***	***	***
Normal VS Tubo+cola+pep	***	***	***	NS
Tubo vazio VS Tubo+cola	NS	NS	NS	*
Tubo vazio VS Tubo+cola+pep	***	NS	***	**
Tubo+cola VS Tubo+cola+pep	***	NS	***	***

Teste ANOVA *one way* com pós teste de Newman-Keuls: \* = p<0,5; \*\* = p<0,01; \*\*\* = p< 0,001; NS = não significante

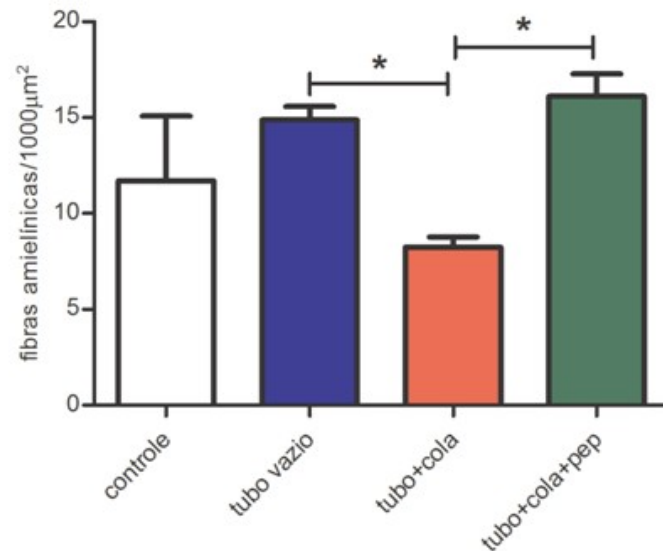
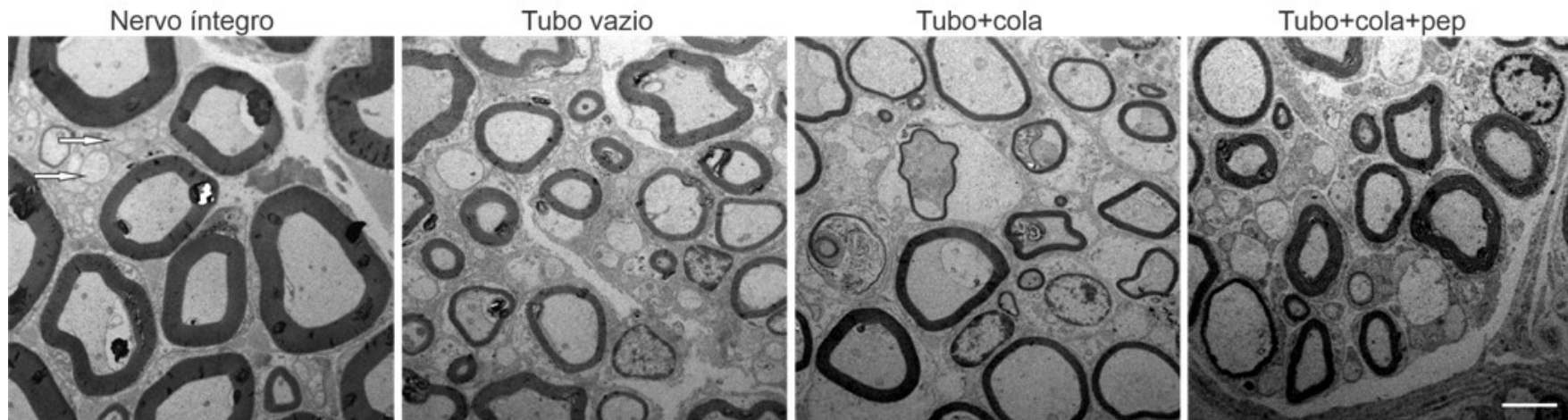


**Figura 13:** Vista panorâmica (primeira coluna, aumento de 10x, escala = 100  $\mu\text{m}$ ) e em maior aumento (segunda coluna, aumento de 1000x, escala = 10  $\mu\text{m}$ ) de seções transversais de nervos íntegros (primeira linha) e de segmentos regenerados dos grupos tubo vazio, tubo+cola e tubo+cola+pep (segunda, terceira e quarta linhas, respectivamente). Coloração: Azul de Toluidina.





**Figura 14:** Contagem de fibras e área da secção transversal dos segmentos nervosos. **A e B:** Quantidade de fibras mielínicas e degeneradas, respectivamente, a cada 1000µm² de segmentos nervosos íntegros (barra branca) e regenerados dos grupos tubo vazio (barra azul), tubo+cola (barra vermelha) e tubo+cola+pep (barra verde). Teste ANOVA *one way* com pós teste de Newman-Keuls (\*\*\*) =  $p < 0,001$  e \*\* =  $p < 0,01$ ). **C e D:** Área da secção transversal e de epineuro na secção transversal, respectivamente, de segmentos nervosos íntegros (barra branca) e regenerados dos grupos tubo vazio (barra azul), tubo+cola (barra vermelha) e tubo+cola+pep (barra verde). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre tais medidas. Teste *U* de Mann-Whitney.



**Figura 15:** Ultraestrutura de secções transversais do nervo íntegro e de segmentos regenerados dos grupos tubo vazio, tubo+cola e tubo+cola+pep. Setas: fibras amielínicas. Escala =5 μm. **Linha inferior:** Quantidade de fibras amielínicas a cada 1000μm<sup>2</sup> de segmentos nervosos íntegros (barra branca) e regenerados dos grupos tubo vazio (barra azul), tubo+cola (barra vermelha) e tubo+cola+pep (barra verde). Teste U de Mann-Whitney (\* p = <0,05).

### **5.7. Os resultados apontam que o grupo tubo+cola+pep teve maior eficiência na regeneração nervosa periférica**

Considerando nota 100 para maior presença, número ou expressão e nota zero para ausência ou menor expressão/quantidade, a Tabela 5 abaixo resume os resultados do presente trabalho, indicando qual o método apresentou maior eficiência nos seguintes aspectos: funcional, inflamação e produção de colágeno, atividade das CS e qualidade do axônio regenerado, aos quais foram dadas notas inteiras: 0, 25, 50, 75 ou 100. No nervo controle normal, ou seja, nervo sem lesão, íntegro, os asteriscos apontam resultados em que eram esperados um valor menor, estando estes dentro da normalidade fisiológica. Por isso, a pontuação geral poderia ficar menor do que os grupos experimentais.

Diante das pontuações na tabela, pudemos notar que maior inflamação e maior atividade de CS caminham juntas, estando ambos os itens elevados no grupo com peptídeo (200 e 275, respectivamente). Para aspecto avaliativo “regeneração do axônio” aparece maior valor e empate entre os grupos tubo vazio e tubo+cola+pep (400 pontos), entretanto, alguns itens dentro desse aspecto quando estão baixos podem indicar melhor regeneração. Assim, um menor número de fibras mielínicas e menor expressão de GAP-43 colocam o grupo tubo+cola+pep mais próximo de um padrão de nervo normal (íntegro), o que pode sugerir uma aceleração das respostas que ocorrem no microambiente do nervo periférico após lesão. Faz sentido pensar em tal observação, visto que esse grupo foi o que apresentou CS mais ativas e com melhor mielinização.

Considerando todos os aspectos avaliados para regeneração nervosa periférica, destacando as pontuações gerais dos três grupos desse trabalho: tubo vazio, tubo+cola e tubo+cola+pep, pode-se identificar que a maior pontuação foi alcançada pelo último grupo indicando que a associação selante de fibrina e peptídeo de ação mimética ao TNF teve melhor eficiência para os itens analisados nesse estudo.

**Tabela 5:** Resumo dos resultados para regeneração nervosa periférica.

		<b>Controle</b>	<b>Tubo vazio</b>	<b>Tubo+cola</b>	<b>Tubo+cola+pep</b>
<b>Funcional</b>	Motor	100	0	0	0
	Sensibilidade	100	25	50	50
		100	25	50	50
<b>Inflamação e colágeno</b>	Geral e macrófago	0*	50	75	100
	I e III	100	50	75	100
		100	100	150	200
<b>Células de Schwann (regenerativas)</b>	NGFRp75	25*	50	75	100
	Diâmetro da fibra mielínica e espessura da mielina	100	50	50	75
	Razão g	100	25	50	100
		225	125	175	275
<b>Regeneração do axônio</b>	Fibra mielínica	50*	100	75	75
	Fibra degenerando	25*	50	100	50
	Fibra amielínica	100	100	50	100
	Diâmetro do axônio	100	50	50	50
	Neurofilamento	100	50	50	50
	GAP-43	25*	100	50	75
		400	400	375	400
<b>Regeneração nervosa periférica</b>		<b>825</b>	<b>650</b>	<b>750</b>	<b>925</b>

Nota 100 equivale à maior quantidade ou expressão e zero (0) à ausência ou menor quantidade ou expressão. Asterisco mostra valores esperados de menor pontuação para nervo controle (íntegro, sem lesão). As linhas cinzas claras apresentam a pontuação para cada aspecto avaliativo (funcional, inflamação e colágeno, células de Schwann, e, regeneração do axônio). A linha inferior, cinza escura, mostra a pontuação total.

## 6. DISCUSSÃO

Para as lesões do nervo periférico do tipo neurotmesa, o reparo e consequente recuperação funcional do local da injúria só são possíveis mediante intervenções cirúrgicas, as quais têm algumas limitações. Nesse contexto, o emprego de condutores nervosos associados a substâncias que possibilitem uma matriz interna propícia à reestruturação do axônio surge como uma alternativa às técnicas de reparo cirúrgicas atualmente estabelecidas (PANAGOPOULOS, MEGALAIKONOMOS E MAVROGENIS, 2017; RICCIO et al, 2018). Neste trabalho, foram utilizados tubos de silicone preenchidos por selante de fibrina ou por selante misturado ao peptídeo de ação mimética ao TNF para reparo de nervo isquiático seccionado. Não foi vista recuperação motora e houve maior sensibilidade bilateral nos grupos com selante de fibrina no interior dos tubos. Com isso, buscou-se avaliar a qualidade do processo regenerativo analisando, para tanto, a presença de CS e de células inflamatórias nos nervos, destacando-se os macrófagos; o comportamento das CS e o crescimento axonal, com quantificação de fibras mielínicas, amielínicas e degeneradas, além dos aspectos morfométricos das fibras regeneradas.

É amplamente aceita a importância da DW em proporcionar um ambiente favorável à regeneração nervosa. A DW se inicia com a degradação de componentes axonais na porção distal à injúria. A descontinuidade axonal gera influxo de cálcio, ativação de calpaínas e perda do contato entre as fibras nervosas e as CS, o que, em conjunto, promove degradação proteolítica do citoesqueleto axonal, desarranjo da barreira hemato-nervosa por ação de metaloproteinases, e desdiferenciação das CS seguida de sua reprogramação, um fenômeno central da DW, em que essas células perdem o arranjo de mielina e passam a expressar um fenótipo em prol da regeneração axonal. Esses eventos ocorrem por volta de 48-96 horas após a lesão (DUBOVY, 2011; DUBOVY, JANCALEK E KUBEK, 2013; JESSEN E MIRSKY, 2016).

Durante a primeira semana após a injúria, as CS participam ativamente da retirada de debris de mielina e de restos axonais. Tal atividade é de extrema importância para a posterior regeneração axonal, visto que os debris de mielina contêm glicoproteína associada à mielina (MAG) e outros inibidores do crescimento do axônio (DUBOVY, 2011; DUBOVY, JANCALEK E KUBEK, 2013). As CS retiram debris de mielina por meio da fagocitose mediada por lectina (DUBOVY, 2011) e da autofagia (JESSEN E MIRSKY, 2016). Cerca de 50% dos debris celulares são retirados nesse período inicial (JESSEN E MIRSKY, 2016).

Com o intuito de atrair macrófagos ao sítio da lesão e tornar o processo de remoção de debris mais eficiente, as CS passam a secretar citocinas, como o TNF, a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), a proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1 (MCP-1), o fator inibidor de leucemia (LIF) e a interleucina 6 (IL-6) (DUBOVY, JANCALEK E KUBEK, 2013; JESSEN E MIRSKY, 2016). Os macrófagos, então, chegam ao local da lesão após 3 a 5 dias do início da DW e alcançam um pico na porção distal aproximadamente 15 dias após a injúria, persistindo no local da lesão ao longo do processo de regeneração. A eficiência da fagocitose realizada por macrófagos é fruto da interação de seus receptores aos componentes do sistema complemento presentes nos debris de mielina (DUBOVY, 2011).

Evidências anteriores sugerem que os macrófagos interagem com as CS, incluindo a regulação da migração, mitose e reprogramação (CATTIN et al, 2015; CHEN et al, 2015; MARTINI et al, 2008, STRATTON et al, 2016). Stratton e colaboradores (2018) mostraram que a presença de macrófagos é essencial para o sucesso do processo de regeneração e encontraram um ligante derivado de macrófagos que promove a desdiferenciação das CS que assume um fenótipo regenerativo e atua na mielinização e crescimento axonal. Em nosso trabalho, as imunomarcações anti-Iba (marcador de macrófago) e anti-NGFRp75 (receptor p75 para NGF, bastante expresso em CS com fenótipo pró-regenerativo) permitiram demonstrar, respectivamente, um grande acúmulo de macrófagos e de CS com fenótipo em prol da regeneração axonal na presença do selante *BthTL*. Ambas as imunomarcações foram ainda mais evidentes com a associação entre selante e peptídeo de ação mimética ao TNF. Esses resultados em conjunto mostraram que o selante *BthTL* por si só proporciona maior resposta das CS frente à lesão e aumento da presença de macrófagos. E que o peptídeo de ação mimética ao TNF potencializa a resposta inflamatória, atraindo células polimorfonucleares e mais macrófagos que podem auxiliar a fagocitose local (DUBOVY, JANCALEK E KUBEK, 2013; JESSEN E MIRSKY, 2016), e pode diretamente influenciar as CS, conforme mostrado por Gao e colaboradores (2019) que relacionou a ausência da ação do TNF com grande diminuição de CS na porção de nervo distal à lesão. Assim, considerando tais observações, é possível inferir que o peptídeo permaneceu funcional após associação ao selante *BthTL* e que teve efeitos sobre as CS, proporcionando aumento da marcação anti-NGFRp75 neste grupo, caracterizando maior presença de CS pró-regenerativas. Com a maior presença de CS, maior atração para macrófagos se dirigirem ao sítio de lesão. E, ainda, como referido acima, o próprio peptídeo já estimula a vinda de mais células inflamatórias. Nesse contexto, a maior imunomarcação para Iba e o maior infiltrado inflamatório foram claramente

observados no grupo tubo+cola+pep. Adicionalmente, as evidências de que o peptídeo sintético permanece funcional com a associação ao selante *BthTL* sugerem que o selante *BthTL* possa funcionar com uma matriz de entrega de drogas no local da lesão (BUCHTA et al, 2004).

Além das células inflamatórias, fundamentais para o sucesso da DW e posterior regeneração nervosa, os componentes da matriz extracelular (MEC) como o colágeno, laminina e as fibronectinas são importantes para o processo regenerativo, pois os axônios que crescem do coto proximal em direção ao órgão alvo são orientados, em parte, por essas moléculas. De acordo com Koopmans e colaboradores (2009), os colágenos de tipo I e III estão presentes no nervo íntegro, onde formam fibrilas necessárias para a montagem normal da MEC. Também está presente o colágeno tipo IV que, por sua vez, irá compor a membrana basal (MB), uma estrutura que envolve as CS e que tem importante papel regulatório sobre os processos de diferenciação dessas células e mielinização. O colágeno tipo IV se associa a outras proteínas da MEC a fim de garantir estabilidade estrutural à MB. Após a injúria, os autores afirmam que tanto as CS reprogramadas como os macrófagos passam a secretar TGF- $\beta$ , promovendo recrutamento de fibroblastos e consequente deposição de colágenos tipos I e III. Se exagerada, tal deposição pode prejudicar a vascularização e levar à formação de cicatriz, a qual funcionará como barreira à regeneração axonal. Esses efeitos, entretanto, só são percebidos com o passar do tempo, quando a deposição se torna mais robusta. Já com relação ao colágeno tipo IV, os autores ressaltaram seu papel pró-regenerativo, já que compõem o arcabouço estrutural que possibilita o arranjo das CS em bandas de Büngner (KOOPMANS, HASSE E SINIS, 2009). Assim, embora tenha ocorrido no grupo tubo+cola+pep uma deposição de colágenos tipos I e III semelhantes aos nervos íntegros, o que poderia ser indicativo de sucesso na organização do arcabouço da MEC, existe o risco dessas moléculas se acumularem nesse grupo com o passar do tempo, comprometendo a regeneração axonal. Apesar da importância do colágeno IV, não tivemos meios de avaliar sua deposição no nervo regenerado, ficando esse ponto para um trabalho futuro.

Nos axônios em crescimento em direção ao órgão alvo, encontram-se cones de crescimento, que são as pontas axonais alongando-se; nelas, destaca-se a proteína 43 associada ao crescimento (GAP-43), uma neuromodulina intracelular que, uma vez fosforilada, induz à estabilização dos filamentos de actina localizados no cone de crescimento, proporcionando alongação e correta orientação dos axônios regenerados (CARRIEL et al, 2014; SKENE et al, 1996). A expressão de GAP-43 em segmento íntegro ocorre em locais

pontuais e pode ser explicada pelo processo contínuo de plasticidade do tecido; já em segmento regenerado, sua expressão é indicativa de axônios recém-formados, ainda imaturos, que vão começar a passar pelo processo de reorganização e estabilização do citoesqueleto (CARRIEL et al, 2014). Assim, era de se esperar que observássemos um aumento significativo na expressão desta proteína em todos os grupos quando comparados aos nervos íntegros. A maior expressão de proteína GAP-43 em segmentos regenerados do grupo tubo vazio evidencia quantidade superior de cones de crescimento e, portanto, maior frequência de ramos axonais em elongação nesse grupo quando comparado aos demais. Esse achado foi uma surpresa, uma vez que se esperava um maior aporte de fatores tróficos nos grupos tubo+cola e tubo+cola+pep já que foram os grupos que mostraram maior presença de CS pró-regenerativas. O crescimento, direcionamento e sobrevivência dos axônios são possíveis mediante liberação de fatores tróficos – como, por exemplo, fator de crescimento neuronal (NGF), fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), neurotrofinas NT-3 e NT-4, N-caderinas, dentre outros – pelo órgão-alvo e pelas CS que compõem as bandas de Büngner (ALLODI, BUDINA E NAVARRO, 2012; JESSEN E MIRSKY, 2016). Dessa maneira, um maior aporte de fatores tróficos, teoricamente, se refletiria em maior quantidade de cones de crescimento e, conseqüentemente, maior expressão de proteína GAP-43 nesses grupos.

Allodi e colaboradores (2012) afirmaram que ao longo do processo de elongação axonal é esperada uma maior quantidade de fibras na porção distal dos segmentos regenerados, visto que cada axônio em regeneração pode originar, inicialmente, mais de dez ramos. De fato, na contagem de fibras mielínicas verificamos aumento destas em todos os grupos quando comparados ao nervo íntegro. A maior quantidade de fibras mielínicas no grupo tubo vazio em comparação aos demais corrobora as imunomarcações anti-GAP-43, isto é, uma quantidade superior de cone de crescimento correspondendo a um maior número de fibras regeneradas em crescimento nesse tubo. Allodi e colaboradores (2012) também afirmaram que, com o passar do tempo, os brotos axonais que não crescem de forma apropriada em sentido de refazer as conexões periféricas tendem a sofrer atrofia e desaparecer, já os axônios que conseguem reinervar os órgãos-alvo passam por um processo de maturação, com aumento de seu diâmetro. Sob esse ponto de vista, a presença de maior quantidade de fibras nervosas não indica regeneração mais eficiente.



O crescimento apropriado dos axônios recém-formados depende muito dos componentes da MEC, destacando-se o colágeno tipo IV como já mencionado. O grupo cujo tubo somente tinha selante mostrou maior quantidade de fibras degeneradas e menor número de fibras amielínicas, podendo indicar menor potencial regenerativo, apesar de outros dados serem positivos (ver Tabela 5). Se, de algum modo o arcabouço de fibrina limitou a síntese de colágeno IV e outros componentes da MEC, poderia explicar esses resultados, e, novamente reforça-se a importância de dosarmos esse colágeno num trabalho futuro. Já, o grupo com selante associado ao peptídeo de ação mimética ao TNF parece ser mais adequado para a regeneração, uma vez que se encontrou menor quantidade de fibras degeneradas e os maiores valores de DFM e EBM quando comparado aos demais tubos, e ainda, remielinização mais adequada para o diâmetro axonal (expressa pela RZG) semelhante àquela vista em nervos íntegros. Assim, os resultados indicaram que o nervo regenerado no interior do tubo com selante e peptídeo estava num momento mais adiantado no processo regenerativo em relação aos grupos tubo vazio e tubo+cola.

Apesar da melhor eficiência morfológica no processo de regeneração axonal na presença do peptídeo de ação mimética ao TNF associado ao selante *BthTL*, o complexo não proporcionou a reinervação do órgão-alvo, o que explica a atrofia muscular vista nos músculos tibiais anteriores ipsilaterais à lesão e a ausência de recuperação motora. Possivelmente, a ausência de recuperação funcional nos animais dos três grupos é explicada pelo curto período de sobrevida após lesão, tendo em vista a severidade da lesão realizada. Cartarozzi e colaboradores (2015) usaram tubos de polímeros sintéticos biodegradáveis preenchidos por selante associado a células mesenquimais no reparo de nervo isquiático; por meio do Catwalk, um sistema de análise computadorizada da marcha, os autores não conseguiram verificar melhora funcional em seus animais até a sétima semana de sobrevida. Também empregando tubos de polímeros biodegradáveis, Pestana e colaboradores (2018) realizaram a cirurgia de tubulização em camundongos e verificaram melhora sensorial após oito semanas de sobrevida, porém ausência de recuperação motora em seus animais. Iman e colaboradores (2017) utilizaram condutores de Cytosan, um biopolímero, e só evidenciaram recuperação funcional após 12 semanas da realização da tubulização. Os estudos citados são evidências de que, independentemente da prótese tubular utilizada, a severidade da lesão é um fator que dificulta a recuperação funcional total do animal em um intervalo de tempo semelhante ao empregado no presente trabalho. Embora nossa ideia inicial fosse um período de sobrevida ligeiramente maior – 60 dias – fomos surpreendidos pelo comportamento de

automutilação em alguns animais. Embora bastante controverso, esse comportamento parece ser uma resposta à dor neuropática em modelos animais, se iniciando com o mordiscar da unha dos três dedos laterais, ocorrendo progressiva roída de dedos que acaba por alcançar o restante da pata, podendo ocorrer edemas ao longo do processo (SARIKCIOGLU, DEMIREL E UTUK, 2008; VAREJÃO et al, 2004). Visando ausência de sofrimento, então, optamos por diminuir o tempo de sobrevida anteriormente previsto.

A análise conjunta de nossos resultados, por fim, mostram que o selante *BthTL* provoca ativação de CS e recrutamento de macrófagos, o que é potencializado com a associação ao peptídeo de ação mimética ao TNF. O peptídeo permanece funcional e tem efeitos benéficos após lesão, possivelmente acelerando o processo de limpeza local e atuando sobre as CS as tornando mais colaborativas ao processo de regeneração nervosa periférica.

## 7. CONCLUSÃO

- O preenchimento de tubos com selante *BthTL*, seja sozinho ou associado ao peptídeo de ação mimética ao TNF, não proporciona melhora sobre a recuperação funcional de nervo isquiático lacerado em 45 dias após o procedimento cirúrgico de tubulização, considerando os métodos de análise empregados no presente projeto;
- O selante *BthTL* tem efeito sobre as CS, provocando aumento de fenótipo pró-regenerativo. Sua ação é potencializada com a associação do peptídeo de ação mimética ao TNF, o que permite inferir que o selante *BthTL* possa funcionar como uma matriz de entrega de drogas;
- A presença do selante *BthTL* proporciona grande acúmulo de macrófagos e de infiltrado inflamatório no local da lesão, e, maior produção de colágeno, o que é potencializado pela associação ao peptídeo de ação mimética ao TNF;
- O selante sozinho *BthTL* apresenta dois aspectos negativos para o crescimento neuronal: maior número de fibras degeneradas e menor quantidade de fibras amielínicas;
- A maior biodisponibilidade de TNF se mostrou benéfica para a regeneração axonal, visto que sua presença proporcionou grau de remielinização semelhante ao nervo íntegro e melhor qualidade do crescimento axonal;
- Considerando o conjunto de resultados obtidos acerca dos aspectos morfológicos dos segmentos regenerados, a melhor técnica de reparo para lesão do tipo neurotmesa do isquiático é a utilização do tubo de silicone com selante *BthTL* associado ao peptídeo de ação mimética ao TNF.

## REFERÊNCIAS

ALLODI, I.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. **Progress in Neurobiology**, v. 98, p. 16-37, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.05.005>

ATRAH, H. I.; Fibrin Glue. **The British Medical Journal**, v. 308, n. 6934, p. 933-934, 1994.

<https://doi.org/10.1136/bmj.308.6934.933>

BARROS, L.C.; SOARES, A.M.; COSTA, F.L.; RODRIGUES, V.M.; FULY, A.L.; GIGLIO JR.; GALLACCI, M.; THOMAZINI-SANTOS, I.A.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; BARRAVIERA, B. JR.; FERREIRA, R.S.; Biochemical and biological evaluation of glyoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 23-33, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000100004>

BASTIEN, D.; LACROIX, S. Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury. **Experimental Neurology**, v. 258, p. 62-77, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.006>

BISCOLA, N.P.; CARTAROZZI, L.P.; ULIAN-BENITEZ, S.; BARBIZAN, R.; CASTRO, M. V.; SPEJO, A.B.; FERREIRA, R.S.; BARRAVIERA, B.; OLIVEIRA A.L.R. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 13, p. 1-11, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s40409-017-0103-1>

BUCHTA, C.; DETTKE, M.; FUNOVICS, P.T.; HOCKER, P.; KNOBL, P.; MACHER, M.; QUEHENBERGER, P.; TREITL, C.; WOREL, N. Fibrin sealants produced by the CryoSeal® FS system: product chemistry, material properties and possible preparation in the autologous preoperative setting. **Vox Sanguinis**, v. 86, n. 4, p. 257-262, 2004.

<https://doi.org/10.1111/j.0042-9007.2004.00516.x>

CARLESS, P. A.; ANTHONY, D. M.; HENRY, D. A. Systematic review of the use of fibrin sealant to minimize perioperative allogeneic blood transfusion. **British Journal of Surgery**, v. 89, n. 6, p. 695-703, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2002.02098.x>

CARRIEL, V.; GARZÓN, I.; CAMPOS, A.; CORNELISSEN, M.; ALAMINOS, M. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, n.2, p. 553-563, 2014. <http://doi.org/10.1002/term.1949>

CARTAROZZI, L. P.; SPEJO, A. B.; FERREIRA JR, R. S.; BARRAVIERA, B.; DUEK, E.; CARVALHO, J. L.; GÓES, A. M.; OLIVEIRA, A. L. R. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. **Brain Research Bulletin**, v. 112, p. 14-24, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.01.005>

CATTIN, A.L.; BURDEN, J.J.; VAN EMMENIS, L.; MACKENZIE, F.E.; HOVING, J.J.; GARCIA CALAVIA, N.; GUO, Y.; MCLAUGHLIN, M.; ROSENBERG, L.H.; QUEREDA, V., JAMECNA, D.; NAPOLI, I.; PARRINELLO, S1.; ENVER, T3.; RUHRBERG, C2.; LLOYD, A. C. Macrophage-induced blood vessels guide Schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 1127–1139, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.021>

CHEN, Y. S.; HSIEH, C. L.; TSAI, C. C.; CHEN, T. H.; CHENG, W. C.; HU, C. L.; YAO, C. H. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. **Biomaterials**, v. 21, n. 5, p. 1541-1547, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00028-4)

CHEN, P.; PIAO, X.; BONALDO, P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. **Acta Neuropathologica**, v. 130, p. 605–618, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1482-4>

CHEN K. B.; UCHIDA, K.; NAKAJIMA, H.; YAYAMA, T.; HIRAI, T.; WATANABE, S.; GUERRERO, A. R.; KOBAYASHI, S.; MA, W.Y.; LIU, S.Y.; BABA, H. Tumor necrosis

factor-alpha antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 36, n. 17, p. 1350–1358, 2011.

<https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181f014ec>

CHIU, D.T. Autogenous venous nerve conduits: a review. **Hand Clinics**, v. 15, p. 667—71, 1999.

DUBOVY, P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. **Annals of Anatomy**, v.193, p. 267-275, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.02.011>

DUBOVY, P.; JANCALEK R.; KUBEK T. Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. **International reviews in Neurobiology**, v. 108, p. 173-206, 2013.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410499-0.00007-1>

FANSA, H.; KEILHOFF, G.; WOLF, G.; SCHNEIDER, W. Tissue engineering of peripheral nerves: A comparison of venous and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 107, p. 485-494, 2001.

<https://doi.org/10.1097/00006534-200102000-00026>

FERRIER, J. MARCHAND, F. BALAYSSAC, D. Assessment of mechanical allodynia in rats using the electronic Von Frey Test. **Bio-protocol**, v. 6, n.18, e1933, 2016.

<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1933>

FIELDS, R.D.; LONGO, J.M.; LE BEAU, F.M.; ELLISMAN, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Progress in Neurobiology**, v. 33, p. 87-134, 1989.

[https://doi.org/10.1016/0301-0082\(89\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0301-0082(89)90036-1)

GAO, Z., MIN, C., XIE, H., QIN, J., HE, X., & ZHOU, S. TNFR2 knockdown triggers apoptosis-induced proliferation in primarily cultured Schwann cells. **Neuroscience Research**.

Disponível online em 4 de fevereiro de 2019. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.01.010>

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 110, p. 2-13, 2011. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-110>

GENOVESE, T.; MAZZON, E.; CRISAFULLI, C.; DI PAOLA, R.; MUIA, C.; ESPOSITO, E.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. TNF-alpha blockage in a mouse model of SCI: evidence for improved outcome. **Shock**, v. 29, n. 1, p. 32-41, 2008.

<https://doi.org/10.1097/shk.0b013e318059053a>

HORIUCHI, T.; MITOMA, H.; HARASHIMA, S.; TSUKAMOTO, H.; SHIMODA, T. Transmembrane TNF-Alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, n. 7, p. 1215-1228, 2010.

<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>

IMAN, M.; ARAGHI, M.; PANAHI, Y.; MOHAMMADI, R. Effects of chitosan-zinc oxide nanocomposites conduit on transected sciatic nerve: an animal model study. **Bulletin of Emergency and Trauma**, v. 5, n. 4, p. 240-248, 2017.

<https://doi.org/10.18869/acadpub.beat.5.4.521>

INSERRA, M. M.; BLOCH, D. A.; TERRIS, D. J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery**, v. 18, p.119-124, 1998.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2752\(1998\)18:2<119::AID-MICR10>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2752(1998)18:2<119::AID-MICR10>3.0.CO;2-0)

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. The repair Schwann cell and its function in regenerative nerves.

**Journal of Physiology**, v. 594, n. 13, p. 3521-3531, 2016. <https://doi.org/10.1113/JP270874>

JONES, S. EISENBERG, H. M.; JIA, X. Advances and Future Applications of Augmented Peripheral Nerve Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, pii E1494, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17091494>

JOHNSON, E. O.; ZOUBOS, A. B.; SOUCACOS, P. N. Regeneration and repair of peripheral nerves. **Injury - International Journal of the care of the Injured**, v. 36, Suppl 4: S24-9, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.10.012>

KALBERMATTEN, D. F.; KINGHAM, P. J.; MAHAY, D.; MANTOVANI, C.; PETERSON, J.; RAFFOUL, W.; BALCIN, H.; PIERER, G.; TERENGI, G. Fibrin matrix for suspension of regenerative cells in an artificial nerve conduit. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 61, n. 6, p. 669-675.

<https://doi.org/10.1016/j.bjps.2007.12.015>

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, S. J. **Principles of Neural Science**. 5ª edição, editora The McGraw Hill Medical, Nova York, Estados Unidos, 2013. ISBN 978-0- 07-181001- 2.

KATO, K.; LIU, H.; KIKUCHI, S.; MYERS, R. R.; SHUBAYEV, V. I. Immediate anti-tumor necrosis factor-alpha (etanercept) therapy enhances axonal regeneration after sciatic nerve crush. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 2, p. 360-368, 2010.

<https://doi.org/10.1002/jnr.22202>

KLEIN, S.; VYKOUKAL, J.; FELTHAUS, O.; DIENCKNECHT, T.; PRANTL, L. Collagen type I conduits for the regeneration of nerve defects. **Materials (Basel)**, v. 9, n. 4, pii E219, 2016. <https://doi.org/10.3390/ma9040219>

KOOPMANS, G.; HASSE, B.; SINIS, N. The role of collagen in peripheral nerve repair. **International Reviews in Neurobiology**, v. 87, p. 363-379, 2009.

[https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)87019-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)87019-0)

KRAM, H. B.; DEL JUNCO, T.; CLARK, S. R.; OCAMPO, H. P.; SHOEMAKER, W. C. Techniques of splenic preservation using fibrin glue. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 30, n. 1, p. 97-101, 1990. <https://doi.org/10.1097/00005373-199001000-00016>

KRIEBEL, A.; HODDE, D.; KUENZEL, T.; ENGELS, J.; BROOK, G.; MEY, J. Cell-free artificial implants of electrospun fibres in a three-dimensional gelatin matrix support sciatic nerve regeneration in vivo. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Publicado online em Wiley Online Library, 2017. <https://doi.org/10.1002/term.2237>



LAMBERTSEN, K. L.; CLAUSEN, B. H.; BABCOCK, A. A.; GREGERSEN, R.; FENGER, C.; NIELSEN, H. H.; HAUGAARD, L.S.; WIRENFELDT, M.; NIELSEN, M.; DAGNAES-HANSEN, F.; BLUETHMANN, H.; FAERGEMAN, N.J.; MELDGAARD, M.; DEIERBORG, T.; Finsen, B. 2009. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 5, 1319–1330, 2009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5505-08.2009>

LIANG, X.; CAI, H.; HAO, Y.; SUN, G.; SONG, Y.; CHEN, W. Sciatic nerve repair using adhesive bonding and a modified conduit. **Neural Regeneration Research**, v. 9, n. 6, p. 594-601, 2014. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.130099>

LITVINOV, R.; WEISEL, J. W. What is the biological and clinical relevance of fibrin? **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 42, n. 4, p. 333-343, 2016. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571342>

LUNDBORG, G. DAHLIN, L. B.; DANIELSEN, N.; GELBERMAN, R. H.; LONGO, F. M.; POWELL, H. C.; VARON, S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. **Experimental Neurology**, v. 36, n. 2, p. 361-375, 1982. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(82\)90215-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(82)90215-1)

LUNDBORG, G.; ROSÉN, B.; DAHLIN, L.; HOLMBERG, J.; ROSÉN, I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. **Journal of Hand Surgery**, v. 29, n. 2, -. 100-107, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jhsb.2003.09.018>

MARCOLINO A. M.; BARBOSA, R. I.; DAS NEVES L. M. S.; MAZZER, N.; GUIRRO, R. R. J.; FONSECA M. C. R. Assessment of functional recovery of sciatic nerve in rats submitted to low-level laser therapy with different fluencies: an experimental study. **Journal of Hand and Microsurgery**, v. 5, n.2, p. 49-53, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12593-013-0096-0>

MARTINI, R.; FISCHER, S.; LÓPEZ-VALES, R.; AND DAVID, S. Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelination disease. **Glia** v. 56, p. 1566–1577, 2008. <https://doi.org/10.1002/glia.20766>

MASSING, M. W.; ROBINSON, G. A.; MARX, C. E.; ALZATE, O.; MADISON, R. D. Applications of Proteomics to Nerve Regeneration Research. **Neuroproteomics – Frontiers in Neuroscience Series**, editora CRC Press Taylor & Francis Group, Flórida, Estados Unidos, 2009. ISBN 9781420076257. <https://doi.org/10.1201/9781420076264.ch15>

MAYHEW, T. M.; SHARMA, A. K. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. I. Methods for nerve trunks of mixed fascicularity. **Journal of Anatomy**, v. 139 (PT 1), p. 45-58, 1984.

MEDINACELI, D. L.; DERENZO, E.; WYATT, R. J. Rat sciatic functional index data management system with digitized input. **Computers and Biomedical Research**. v.17, p.185-92, 1984. [https://doi.org/10.1016/0010-4809\(84\)90031-4](https://doi.org/10.1016/0010-4809(84)90031-4)

MOLLER, K. A.; JOHANSSON, B. BERGE, O. G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 84, n. 1-2, p. 41-47, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(98\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(98)00083-1)

MONTANARI, T. **Histologia: Texto, Atlas e Roteiro de Aulas Práticas**. 3ª edição, edição do autor, Porto Alegre, Brasil. Livro digital disponível em <<http://www.ufrgs.br/livrodehisto>>, 2016. ISBN: 978-85-915646-3-7.

NARYAN, S. K.; ARUMUGAM, M. CHITTORIA, R. Outcome of human peripheral nerve repair interventions using conduits: a systematic review. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 15, n. 396, p. 18-24, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.10.012>

OKUDA, T.; FUJITA, M.; YOSHIKA, H.; TASAKI, T.; KATO, A. Novel surgical technique to solidify cyst-type metastatic brain tumors using autologous fibrin glue for complete resection. **Surgical Neurology International**, v.5, n. 10, 2014. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.135304>

OLIVEIRA, A. L. R.; LANGONE, F. GM-1 ganglioside treatment reduces motoneuron death after ventral root avulsion in adult rats. **Neuroscience Letters**, v. 293, p. 131-134, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01506-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01506-8)

OLIVEIRA, A.L.R.; PIERUCCI, A.; PEREIRA, K. B. Review: peripheral nerve through the nerve tubulization technique. **Journal of Morphological Science**, v. 21, p. 225–231, 2004.

OLIVEIRA, F.; SOUSA, B. B.; MAMEDE, C. C. N.; MORAIS, N. C. G.; QUEIROZ, M. R.; PEREIRA, D. F. C.; MATIAS, M. S.; BRANDEBURGO, M. I. H. Biochemical and functional characterization of BmooSP, a new serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 11, p. 130-138, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.01.055>

PANAGOPOULOS, G. N., MEGALOIKONOMOS, P. D., & MAVROGENIS, A. F. The Present and Future for Peripheral Nerve Regeneration. **Orthopedics**, v. 40, n.1, p. e141–e156, 2017. <https://doi.org/10.3928/01477447-20161019-01>

PARENTI, G. LENZI, B. Clinical and Angiographic Results in 47 Microsurgical Anastomoses for Cerebral Revascularization. **Fibrin Sealant in Operative Medicine – Volume 2: Ophthalmology Neurosurgery**. Editora Springer, ISBN 978-3-540-16828-7, 1986. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-71391-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-71391-0_17)

PERTICI, V.; LAURIN, J.; MARQUESTE, T.; DECHERCHI, P. Comparison of a collagen membrane versus a fibrin sealant after a peroneal nerve section and repair: a functional and histological study. **Acta Neurochirurgica**, v. 156, n. 8, p. 1577-1590, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00701-014-2117-6>

PESTANA F.M.; DOMINGUES, R.C.C.; OLIVEIRA, J.T.; DURÇO, D.F.P.A.; GOULART, C.O.; MENDONÇA, HR.; DOS SANTOS, A.C.R.; DE CAMPOS, N.T.; DA SILVA, B.T.; PEREIRA, C.C.; BORGES, C.P.; MARTINEZ, A.M.B. Comparison of morphological and functional outcomes of mouse sciatic nerve repair with three biodegradable polymer conduits containing poly(lactic acid). **Neural Regeneration Research**, v. 13, n.10, p.1811-1819, 2018. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.238712>

PFISTER, L.A.; PAPALOIZOS, M.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 12, n. 2, p. 65-82, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2007.00125.x>

RAFIJAH, G.; BOWEN, A. J.; DOLORES, C.; VITALI, R.; MOZAFFAR, T.; GUPTA, R. The effects of adjuvant fibrin sealant on the surgical repair of segmental nerve defects in an animal model. **Journal of Hand Surgery (American Volume)**, v. 38, n. 5, p. 847-855, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2013.01.044>

RICCIO, M.; MARCHESINI, A.; PUGLIESE, P.; FRANCESCO, F. Nerve repair and regeneration: biological tubulization limits and future perspectives. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 4, p. 3362-3375, 2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.27299>

ROTSHENKER, S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 109, p. 1-14, 2011. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-109>

SARIKCIOGLU, L.; DEMIREL, B. M.; UTUK, A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. **Folia Morphologica**, v. 68, n. 1, pp 1-7, 2008.

SARKER, M.; SAMAN, N.; MCLNNES, A. D.; SCHREYER, D. J.; XIONGBIAO, C. Regeneration of peripheral nerves conduits by nerve guidance conduits: influence of design, biopolymers, cells, growth factors and physical stimuli. **Progress in Neurobiology**, v. 171, p. 125-150, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.07.002>

SEKHAR, L. N.; NATARAJAN, S. K.; MANNING, T.; BHAGAWATI, D. The use of fibrin glue to stop venous bleeding in the epidural space, vertebral venous plexus and anteriorcavernous sinus: technical note. **Neurosurgery**, v. 61 (3 Suppl): discussion E51, 2007. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000289711.95426.50>

SIMIONESCU, L. Traumatic Mononeuropathies. **Plataforma UpToDate**. Disponível em <<http://www.uptodate.com/contents/traumatic-mononeuropathies>> acessado em 23/02/2017.

SIQUEIRA, R. Lesão Nervosa Periférica: uma revisão. **Revista Neurociências**, v. 15, n. 3, p. 226-233, 2017.

SILVA, J. R. C. *Mapeamento de peptídeos ligantes ao receptor do Fator de Necrose Tumoral Alfa*. 2015. 60f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

SKENE, J. H.; JACOBSON, R. D.; SNIPES, G. J.; MCGUIRE, C. B.; NORDEN, J. J.; FREEMAN, J. A. A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. **Science**, v. 233, n. 4765, p.783-786, 1986.

<https://doi.org/10.1126/science.3738509>

SMITH, R. S.; KOLES, Z. J. Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity. **American Journal of Physiology**, v. 219, n. 5, p. 1256-1258, 1970.

<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1970.219.5.1256>

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, 1985.

<https://doi.org/10.1126/science.4001944>

STRATTON, J. A.; SHAH, P.T. Macrophage polarization in nerve injury: do Schwann cells play a role? *Neural Regen. Res*, v. 11, n. 1, p. 53–57, 2016.

<https://doi.org/10.4103/1673-5374.175042>

STRATTON, J. A.; HOLMES, A.; ROSIN, N. L.; SINHA, S.; VOHRA, M.; BURMA, N. E.; TRANG, T.; MIDHA, R.; BIERNASKIE, J. Macrophages Regulate Schwann Cell Maturation after Nerve Injury. **Cell Reports**, v. 24, n. 10, p. 2561-2572, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.004>

SULLIVAN, R.; DAILEY, T.; DUNCAN, K.; ABEL, N.; BORLONGAN, C. V. Peripheral Nerve Injury: Stem Cell Therapy and Peripheral Nerve Transfer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1-12, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17122101>

TSE, R.; KO, J. H. Nerve Glue for Upper Extremity Reconstruction. **Hand Clinics**, v. 28, n. 4, p. 529-140, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2012.08.006>

TU, H.; ZHANG, D.; CORRICK, R. M.; MUELLEMAN, R. L.; WADMAN, M. C.; LI, Y. L. Morphological regeneration and functional recovery of neuromuscular junctions after tourniquet-induced injuries in mouse hindlimb. **Frontiers in Physiology**, v. 8, artigo 2017. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00207>

VAREJÃO, A. S. P.; MELO-PINTO, P.; MEEK, M. F.; FILIPE, V. M.; BULAS-CRUZ, J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration; **Neurological Research**, v. 26, n. 2, p. 186-194, 2004. <https://doi.org/10.1179/016164104225013833>

WAXMAN, S. G. Determinants of conduction velocity in myelinated nerve fibers. **Muscle Nerve**, v. 3, n. 2, p. 141-150, 1980. <https://doi.org/10.1002/mus.880030207>

WHITLOCK, E. L.; KASUKURTHI, R.; YAN, Y.; TUNG, T. H.; HUNTER, D. A.; MACKINNON, S.E. Fibrin glue mitigates the learning curve of microneurosurgical repair. **Microsurgery**, v. 30, n. 3, p.218-222, 2010. <https://doi.org/10.1002/micr.20754>

WU, F.; XING, D.; PENG, Z.; RAO, T. Enhanced rat sciatic nerve regeneration through silicon tubes implanted with Valproic Acid. **Journal of Reconstructive Surgery**, v. 24, n. 4, p. 267-276, 2008. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1078696>

YUAN, Q.; YANG, H.; CHENG, C.; LI, C.; WU, X.; HUAN, W.; SUN, H.; ZHOU, Z.; WANG, Y.; ZHAO, W; LU, X.; SHEN, A.  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase I involved in Schwann cells proliferation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha via the activation of MAP kinases signal pathways. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 365 n. 1-2, p. 149–158, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1254-6>

## ANEXOS

### ANEXO A: Certificado de aprovação do projeto emitido pela Comissão de ética na utilização animal da Universidade Federal de Uberlândia



Universidade Federal de Uberlândia  
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito do selante de fibrina *BthTI* na regeneração axonal e recuperação funcional após lesão nervosa periférica”, protocolo nº 063/17, sob a responsabilidade de **Renata Graciele Zanon** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **29 de setembro de 2017**.

(We certify that the project entitled “Efeito do selante de fibrina *BthTI* na regeneração axonal e recuperação funcional após lesão nervosa periférica”, protocol 063/17, under the responsibility of Renata Graciele Zanon - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of September 29th, 2017).

Vigência do Projeto	Início: 01/11/2017 Término: 30/09/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ratos Wistar
Número de animais	40
Peso / Idade	200 g / 8 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	CBEA/UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 03 de outubro de 2017.

**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**  
Coordenador da CEUA/UFU

## **ANEXO B: Descrição histopatológica dos nervos (transcrição do laudo)**

### Nervos íntegros

Os cortes histológicos corados em H.E. revelam fragmentos de nervos em corte longitudinal apresentando fibras nervosas permeadas por células de Schwann e envolvidas por porções de perineuro e epineuro. Não foram observadas áreas de inflamação, necrose ou qualquer outra alteração histopatológica.

Conclusão: Fragmentos de nervos com aspectos usuais de normalidade.

### Grupo tubo vazio

Os cortes histológicos corados em H.E. revelam fragmentos de nervo em corte longitudinal apresentando pequenos focos de leve infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear constituído por linfócitos e plasmócitos. Esses focos são concentrados na periferia do nervo próximo ao epineuro. Notam-se inúmeros macrófagos.

Conclusão: Fragmento de nervo com leve infiltrado inflamatório linfoplasmocitário.

### Grupo cola

Os cortes histológicos corados em H.E. revelam fragmentos de nervo em corte longitudinal apresentando moderado infiltrado inflamatório predominantemente linfoplasmocitário. Este infiltrado estende-se ao longo de todo o nervo, porém concentrado na periferia, próximo ao epineuro, porém, aparentemente, sem invadir a área das fibras nervosas. Observam-se inúmeros macrófagos, plasmócitos e linfócitos.

Conclusão: Fragmento de nervo com moderado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário.

### Grupo peptídeo

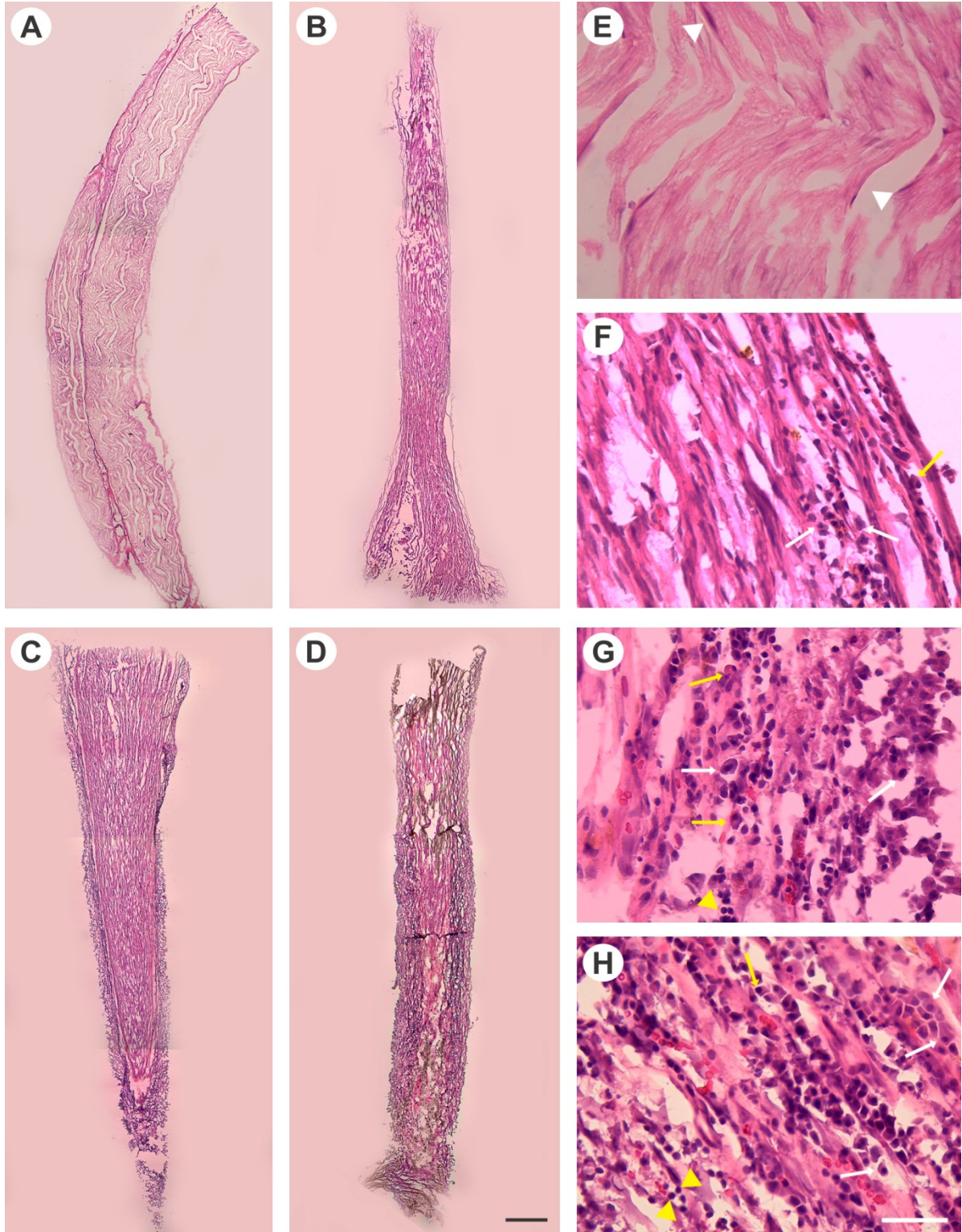
Os cortes histológicos corados em H.E. revelam fragmentos de nervo em corte longitudinal apresentando, ao longo de todo o segmento, de moderado a intenso infiltrado inflamatório predominantemente linfoplasmocitário concentrado na periferia do nervo próximo ao epineuro e invadindo a área das fibras nervosas. Observam-se inúmeros macrófagos, plasmócitos e linfócitos.

Conclusão: Fragmento de nervo com moderado a intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário.



Com relação ao grau de inflamação:

30 peptídeo esquerdo > 39 cola esquerdo > 45 controle esquerdo



**Anexo B:** Descrição histopatológica dos nervos. **A-D:** visão panorâmica (10x, escala = 500  $\mu$ m) e em maior aumento (**E-H**, 40x, escala = 50  $\mu$ m) de secções longitudinais de nervos íntegros (**A** e **E**) e de segmentos regenerados do grupo tubo vazio (**B** e **F**), tubo+cola (**C** e **G**) e tubo+cola+pep (**D** e **H**). Cabeças de setas brancas: núcleo de CS. Cabeças de setas amarelas: linfócitos. Setas brancas: macrófagos. Setas amarelas: plasmócitos.