

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Uso do selante de fibrina *BthTL* e do peptídeo mimético de TNF na lesão de nervo
isquiático: impacto nas respostas na medula espinal**

Juliane Ferreira da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Renata Graciele Zanon (ICBIM)

Coorientadora: Táríka Gonçalves do Carmo Oliveira (Unicamp)

Uberlândia – MG

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Uso do selante de fibrina *BthTL* e do peptídeo mimético de TNF na lesão de nervo isquiático: impacto nas respostas na medula espinal

Projeto de Pesquisa apresentado como requisito para a aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado da Universidade Federal de Uberlândia.

Homologado pela coordenação do Curso de Ciências Biológicas em __/__/__

Profª. Dra. Vanessa Stefani Sul Moreira

Uberlândia - MG

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Curso de Graduação em Biologia -
Uberlândia

Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 30 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902

Telefone: 3225-8638 - graduacao@inbio.ufu.br e colbi3@inbio.ufu.br e assuntoseducacionais@inbio.ufu.br



ATA DE DEFESA - GRADUAÇÃO

Ata da defesa de Trabalho de Conclusão de Curso junto ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia.

Data: 28 de maio de 2021

Discente: Juliene Ferreira da Silva

Matrícula: 11711BIO028

Título do Trabalho: “Uso do selante de fibrina BthTL e do peptídeo mimético de TNF na lesão de nervo ciático: impacto nas respostas na medula espinal”

Grau: Bacharelado

Às 14 horas do dia 28 de maio do ano de 2021, na plataforma de reuniões virtuais Google Meet reuniu-se a banca examinadora, composta pelos seguintes membros: Me Alex Dias Assis, Ma. Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas e Dra Renata Graciele Zanon orientadora da discente.

Iniciando os trabalhos, a Presidente da mesa, Dra Renata Graciele Zanon apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradecendo a presença do público e concedendo à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente, o tempo de arguição e resposta foram estabelecidos conforme as normas do Curso.

A seguir, a Senhora Presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir a discente. Finalizada a arguição, que ocorreu dentro dos termos regimentais, a banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a banca examinadora considerou a discente aprovado com nota final de 95 pontos, sugerindo novo título para o trabalho (quando couber):

Nada mais havendo a tratar, foram encerrados os trabalhos às 15 horas e 05 minutos. Foi lavrada a presente ata que, após lida e aprovada, foi assinada pela banca examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Graciele Zanon, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/05/2021, às 14:25, 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 **ALEX DIAS ASSIS, Usuário Externo**, em 31/05/2021, às 15:12, 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 **Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas, Usuário Externo**, em 31/05/2021, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

https://www.sei.ufu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=3156655&infra_siste... 1/2 07/06/2021 SEI/UFU - 2805135 - Ata de Defesa - Graduação



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,

informando o código verificador **2805135** e o código CRC **78080D0E**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades e por me fortalecer todos os dias. Sem ele nada disso seria possível.

Aos meus pais Emilene e Junio e meus irmãos Emily e Ezequiel, pelo amor, ensinamentos, pela torcida, todo apoio e principalmente por serem minha base e acreditarem em mim quando nem eu acreditava.

Aos meus avós Marcos e Hilda e meu tio Hudson por me apoiarem de todas as formas possíveis fazendo com que o sonho de se formar hoje seja real, em especial ao Hudson que sempre me apoiou em cada sonho que tive.

Aos meus amigos da faculdade (Cesar, Milena, Rafaela, Maria Tereza, Rayane, Isabella, Taynara, Alexia) por me acompanharem ao longo dessa jornada, por tornarem tudo mais leve e cheio de amor e por me apoiarem até o final dessa jornada.

Ao meu namorado, Jonathan, por me auxiliar não somente tornando mais leve e feliz a minha vida, mas também me auxiliando até no momento de realizar todo trabalho.

À minha orientadora Dra. Renata Zanon e co-orientadora Ms. Tarika Gonçalves pela oportunidade e paciência, pelos diversos ensinamentos e dedicação ao ensino e a pesquisa.

Ao pessoal do Lamoc por me acolherem com tanto carinho, em especial a Tarika pela parceria, conselhos e ensinamentos e principalmente por me incluir tão bem em um trabalho que é muito mais dela que meu.

Ao professor Elisandro Souza que despertou em mim o desejo de fazer Biologia, devido ao seu grande desempenho e amor ao lecionar Biologia para o ensino médio.

À Universidade Federal de Uberlândia por proporcionarem minha formação.

Por fim aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas contribuições para o meu trabalho.

RESUMO

Lesões em nervos periféricos são recorrentes, haja visto que estão amplamente distribuídos em todo corpo. Em casos de lesões do tipo neurotmeze (secção total), se faz necessário uma intervenção cirúrgica para realinhamento dos cotos a fim de que a regeneração ocorra de forma linear e sem ocorrência de neuromas. A resposta neuronal a esse tipo de lesão vai depender de fatores como a gravidade da lesão, tipo neuronal, proximidade da lesão com o corpo celular e se a interação do Sistema Nervoso Central com o alvo é restaurada, uma vez que os corpos celulares dos nervos periféricos residem na medula espinal e nos gânglios da raiz dorsal. Visto isso, nossa equipe demonstrou que o selante de fibrina *BthTL* associado a um peptídeo de ação mimética ao TNF resultou em maior quantidade de células inflamatórias e de células de Schwann com fenótipo pró-regenerativo o que acarretou rápida remielinização e maior eficiência do reparo. Sabendo-se que uma lesão de nervo provoca alterações retrógradas no corpo celular e em células circunjacentes aos neurônios lesionados, esse trabalho analisou as alterações em nível medular. Foram realizadas contagem de neurônios no corno anterior e ainda análise de expressão de GFAP e Iba-1 para identificarmos atividade da glia. Considerando os resultados obtidos, o preenchimento de tubos com selante *BthTL*, seja sozinho ou associado ao peptídeo de ação mimética ao TNF, não proporciona alterações nas variáveis analisadas na medula após o tratamento de lesão do nervo isquiático.

Palavras-chaves: selante, lesão nervosa, sistema nervoso central, isquiático, neurônio medular.

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries are recurrent, as they are widely distributed throughout the body. In cases of neurotmesis-type injuries (total section), surgical intervention is necessary to realign the stumps so that regeneration occurs linearly and without the occurrence of neuromas. The neuronal response to this type of injury will depend on factors such as the severity of the injury, neuronal type, proximity of the injury to the cell body and whether the interaction of the Central Nervous System with the target is restored, since the nerve cell bodies reside in the spinal cord and dorsal root ganglia. In view of this, our team demonstrated that the BthTL fibrin sealant associated with a peptide with a mimetic action to TNF resulted in a greater number of inflammatory cells and Schwann cells with pro-regenerative phenotype, which resulted in rapid remyelination and greater repair efficiency. Knowing that a nerve injury causes retrograde changes in the cell body and in surrounding cells, this work analyzed the changes at the spinal level. Neuron counts in the anterior horn and GFAP and Iba-1 expression analysis were performed to identify glial activity. Considering the results obtained, filling tubes with BthTL sealant, either alone or associated with the TNF-mimetic peptide, does not provide changes in the variables analyzed in the spinal cord after the treatment of sciatic nerve injury.

Key words: sealant, nerve damage, central nervous system, ischiatic, medullary neuron.

Sumário

1-INTRODUÇÃO.....	8
1.1- Sistema Nervoso: medula espinal e nervo periférico.....	8
1.2- Lesão e regeneração em nervos periféricos.....	9
1.3- Alterações centrais após a lesão nervosa periférica	10
1.4- Selante de fibrina e reparo de nervos periféricos	11
2-OBJETIVOS.....	13
2.1- Objetivo geral:.....	13
2.2- Objetivos específicos:.....	13
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1- Animais	13
3.2- Síntese do selante de fibrina e do peptídeo mimético ao TNF.....	14
3.3- Procedimento cirúrgico para a tubulização	14
3.4- Coloração de Nissl e Imunofluorescência	16
3.5- Análise estatística	17
4- RESULTADOS	18
4.1- O uso do selante e do peptídeo no interior da prótese de silicone não modificou o número de neurônios motores no corno anterior da medula.....	18
4.2- O uso do selante e do peptídeo no interior da prótese de silicone aparentemente não interfere na reatividade da glia após 45 dias.....	19
5- DISCUSSÃO.....	21
6- CONCLUSÕES.....	22
7- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	22

1-INTRODUÇÃO

1.1- Sistema Nervoso: medula espinal e nervo periférico

O Sistema Nervoso é uma rede complexa, muito organizada com bilhões de neurônios. Pode ser dividido em Sistema Nervoso Central (SNC - compreendendo encéfalo e medula espinal) e Sistema Nervoso Periférico (SNP - constituído por nervos, gânglios e receptores sensoriais) (TORTORA & DERRICKSON, 2010).

A medula espinal está localizada dentro do canal medular, não se estendendo por todo comprimento do canal vertebral, ela possui 31 segmentos, 30 destes dá origem a um par de nervos espinais, sendo que o último segmento emerge um nervo ímpar (EKMAN, 2008). A medula espinal possui a substância cinzenta que é central, envolvida pela substância branca que fica na periferia. A substância cinzenta tem forma de “H” e é composta por corpos celulares, fibras não mielinizadas, vários neurônios internúcleares que transmitem impulsos motores e sensoriais entre as raízes nervosas dorsais e ventrais de um lado para o outro e de um nível da medula para o outro. No chamado H medular distingue-se de cada lado colunas ou cornos. Os cornos ventrais ou anteriores possuem os neurônios motores inferiores que recebem impulsos dos neurônios internúcleares e de fibras aferentes dos fusos musculares. Os cornos dorsais ou posteriores possuem fibras sensoriais que tem origem nos corpos celulares dos gânglios das raízes dorsais. A substância branca por sua vez contém tratos descendentes e ascendentes de fibras nervosas motoras e sensoriais mielinizadas (KANDEL et al., 2013).

O nervo espinal é formado pela fusão de duas raízes: a raiz dorsal que consiste em vários tipos de fibras aferentes organizadas, de modo que a fibras de maior diâmetro sejam mediais às menores. As maiores fibras são fortemente mielinizadas e conduzem reflexos como alongamento muscular, transporte de informações dos fusos musculares e órgão tendinoso de Golgi. As fibras de médio porte transmitem impulsos dos mecanorreceptores da pele e das articulações. Já as fibras menores mielinizadas e não mielinizadas transmitem sensações térmicas e nocivas. Após, as raízes anteriores e posteriores se juntam para formar nervos espinais que se dividem em um menor e um maior ramo ventral primário. Os nervos se ramificam e inervam várias partes do corpo e são denominados nervos periféricos (BICAN et al., 2013).

O axônio ou fibra nervosa é um prolongamento do neurônio. O axônio é uma estrutura tubular formado pelo axolema (camada externa e fina) com um material viscoso dentro denominado axoplasma. O axoplasma é uma estrutura dinâmica que se estende do corpo celular na medula espinal através do axônio até os terminais distais. Várias substâncias são

transportadas por meio de fluxo axoplasmático, percorrendo o nervo até os terminais nervosos, esse fluxo pode ser anterógrado quando as substâncias são exportadas para periferia do axônio ou retrógrado quando ocorre o transporte de substâncias ou restos celulares para o núcleo (BATTISTA & LUSKIN, 1986).

A taxa de condução de resposta está relacionada com o tamanho da fibra, mas principalmente com a forma com que as células de Schwann (CSs) se organizam, haja visto que uma fibra mielinizada possui condução saltatória sendo de um nodo de Ranvier (segmento do axônio desprovido de mielina) para outro, diferentemente de uma fibra não mielinizada ou amielínica. (BATTISTA & LUSKIN, 1986). Além de promover maior velocidade na condução do impulso nervoso, as CSs também tem importante papel na regeneração de nervos periféricos após lesão, situação em que adquirem caráter proliferativo e passam a secretar diversas moléculas que garantem crescimento, direcionamento e sobrevivência do axônio regenerado (JESSEN & MIRSKY, 2016). Os axônios se organizam em feixes e estão envoltos por tecido conjuntivo denominado perineuro. Da mesma forma, o conjunto de feixes está envolto por conjuntivo, sendo esse denominado epineuro camada mais externa e perineuro que reveste cada fascículo nervoso. Ainda, tem-se o endoneuro que envolve individualmente cada fibra nervosa (BATTISTA & LUSKIN, 1986).

1.2- Lesão e regeneração em nervos periféricos

Lesões em nervos periféricos são recorrentes, visto que têm uma ampla distribuição em todo o corpo. As causas mais comuns são os traumas de estiramento nervoso, lesões por percussão, injúrias por causa autoimune, iatrogenias e lesões decorrentes de desordem metabólica (KANDEL et al., 2013; JONES et al., 2016).

A classificação comumente utilizada para lesões em nervos periféricos é neuropraxia, axonotmese e neurotmeze. A neuropraxia envolve bloqueio da condução nervosa e desmielinização focal sem qualquer degradação axonal. A axonotmese diz respeito à interrupção do axônio além da bainha de mielina gerando danos irreversíveis, no entanto sem o comprometimento do conjuntivo (perineuro e epineuro) o que possibilita dependendo da particularidade anatômica um reparo espontâneo do segmento nervoso via ocorrência de degeneração Walleriana. Por último, a neurotmeze, nesta, tanto o axônio quanto a bainha de mielina e envoltórios conjuntivos estão irreversivelmente danificados tornando-se necessário intervenção cirúrgica para realinhamento dos cotos para que a regeneração possa ocorrer de forma linear sem ocorrer a formação de neuromas (SULLIVAN et al., 2016).

No segmento distal ao dano é possível observar a degeneração Walleriana, que é um conjunto de eventos que tem início após a degradação do axoplasma e axolema, seguido da destruição da mielina e do axônio, gerando assim detritos axonais que são removidos pelas CSs e por macrófagos que invadem o local (BEIROWSKI et al., 2005). Diversos pesquisadores estudaram a possibilidade da degeneração ocorrer em tempos diferentes dependendo do tamanho da fibra miélica, porém muitos chegaram à conclusão de que a degeneração ocorre de forma simultânea ao longo do axônio (DONAT & WISNIEWSKY, 1973; MALBOUISSON et al., 1984; MALBOUISSON et al., 1985). Algumas horas após da lesão, a região imediatamente distal à zona lesionada apresenta acúmulo de organelas e edema endoneural. Após estas primeiras alterações, a desintegração granular do citoesqueleto axoplasmático segue, e, aproximadamente 48 horas depois, já se detectam poucas fibras normais (SCHLAEPFER & HASLER, 1979; GEORGE et al., 1995). Cerca de 18 horas após o início da desintegração do citoesqueleto, as CSs proliferam e atingem o máximo dessa proliferação em aproximadamente quatro dias, as células resultantes desse processo formam cadeias que se ajustam formando as bandas de Büngner (GRIFFIN & HOFFMAN, 1993).

1.3- Alterações centrais após a lesão nervosa periférica

Uma vez que os corpos celulares dos nervos periféricos residem na medula espinal e nos gânglios da raiz dorsal, após uma lesão nos nervos periféricos, os axônios distais ao local da lesão perdem sua conexão com os corpos neuronais. Após a lesão do nervo periférico, os neurônios sobreviventes sofrem uma série de alterações morfológicas e funcionais, compreendendo aumento nuclear e nucleolar, excentricidade nuclear, cromatólise (SUN et al., 2018). O tempo e a intensidade da resposta neuronal ocorrem de diferentes formas por diversos fatores como: gravidade da lesão, proximidade da lesão com o corpo celular, tipo neuronal e se a interação do SNC com o alvo é restaurada (GROVES et al., 1999).

A microglia na medula espinal responde rapidamente, regulando a síntese e expressão dos receptores da superfície celular e aumentando a liberação de citocinas próinflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF) (MARCHAND et al., 2005). Os astrócitos também respondem intensamente após a lesão, essas células são encontradas em grande número e se caracterizam pelos seus numerosos prolongamentos. Os astrócitos participam e modulam a sinapses, agindo também na formação da cicatriz glial após lesões centrais, além de todas essas funções, eles representam elementos fundamentais no processo de plasticidade sináptica após lesão nervosa e o aumento de GFAP, proteína que constitui a rede de filamentos intermediários do citoesqueleto dos astrócitos, faz com que essas células

fiquem maiores com prolongamentos mais espessos, afim de proteger os neurônios mantendo o tecido íntegro (ASSIS, 2015).

1.4- Selante de fibrina e reparo de nervos periféricos

O selante de fibrina é composto por fibrinogênio e trombina, estas são combinadas durante a aplicação do produto pois a trombina converte o fibrinogênio em fibrina por meio de reação enzimática, o que gera uma solução que solidifica rapidamente se aderindo ao tecido (ATRAH, 1994).

Na prática clínica, pesquisadores demonstraram que o selante de fibrina é uma boa alternativa à microcirurgia de sutura de epineuro, normalmente realizada após uma neurotmeze, além disso, o selante pode auxiliar na redução da inflamação associada à sutura, promovendo também um processo regenerativo melhor (WHITLOCK et al., 2010; BISCOLA et al., 2017). Estudos não evidenciaram dano sobre o crescimento axonal ou sobre a recuperação funcional do nervo lesado com uso de selante de fibrina (TSE & KO, 2012; RAFIJAH et al., 2013).

O selante pode ser usado diretamente no nervo ou adicionado no interior de tubos, geralmente de biomateriais ou materiais inertes como o silicone, para propiciar um ambiente mais adequado às respostas celulares após uma lesão nervosa periférica, essa técnica de colocação de tubos para o reparo de nervos é denominada tubulização. Usando essa técnica, foi demonstrado que os selantes de fibrina promoveram uma melhor aderência de CSs ao lúmen de condutores artificiais, obtendo maior eficiência na regeneração axonal (KALBERMATTEN et al., 2008; CARTAROZZI et al., 2015). PERTICI e colaboradores (2014) também demonstraram que o uso de fibrina associada à tubulização na reparação nervosa fibular permitiu melhora funcional sem formação de neuomas.

Em nosso trabalho usaremos um selante de fibrina desenvolvido na Universidade Federal de Uberlândia sob coordenação do Professor Fábio Oliveira (2016). O selante desenvolvido foi obtido da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* e patenteado com o nome de “*BthTL*”.

Esse tipo de selante pode ser usado como agente homeostático em procedimentos cirúrgicos como esplenectomia, trauma hepático, microcirurgia hepática entre outros, também pode ser usado como vedante em cortes de nervos e tendões (BARROS et al., 2011; KRAM et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2016). Especificamente o selante *BthTL* já foi testado em reparo do nervo isquiático e mostrou efeito benéfico para a regeneração axonal, acelerando-a (GONÇALVES, 2019).

1.5- Fator de necrose tumoral (TNF) e regeneração nervosa

O TNF é uma citocina secretada por macrófagos e monócitos e está relacionada com a regulação da imunidade natural ou inata (HORIUCHI et al., 2010). O TNF interage como o receptor para TNF tipo 1 (TNFR1) que é bastante expresso no SNC e possui grande afinidade com o TNF solúvel, este tem um domínio de morte o qual uma vez ativado pode controlar expressão de proteínas anti-apoptóticas ou também conduzir a célula à necroptose ou à apoptose. O TNF pode interagir também com o receptor para TNF do tipo 2 (TNFR2) que é mais expresso pela microglia e pelas células endoteliais e uma vez ativado induz a expressão de fatores pró-inflamatórios e anti-apoptóticos (BASTIEN & LACROIX, 2014). Os receptores TNFR1 e TNFR2 estão presentes em CSs, onde são responsáveis por mediar funções biológicas diversas (YUAN et al., 2012). Quanto ao efeito do TNF sobre lesões de nervos periféricos, sabe-se que está relacionado com o aumento da fagocitose de debris de mielina devido ao maior recrutamento de macrófagos, o que é extremamente importante para uma regeneração bem-sucedida (YUAN et al., 2012).

A fim de obter moléculas imunomoduladoras foram desenvolvidos pelos pesquisadores Jéssica Regina Costa Silva e Carlos Ueira-Vieira do Instituto de Biotecnologia “Warwick Estevam Kerr” da Universidade Federal de Uberlândia, peptídeos de ação mimética ao TNF por meio da técnica conhecida como *Phage Display* (SILVA, 2015). Um desses peptídeos foi testado, junto ao selante de fibrina, na regeneração nervosa periférica por nosso laboratório (LAMOC). O prolongamento da disponibilidade de TNF pareceu ter efeitos benéficos para a regeneração nervosa periférica: as pesquisadoras Táríka Gonçalves do Carmo Oliveira e outros, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia demonstraram que a associação do peptídeo de ação mimética ao TNF anteriormente citado ao selante de fibrina *BthTL*, ambos inseridos em prótese condutora de natureza sintética, proporcionou maior quantidade de células inflamatórias – em especial de macrófagos – e de CS com fenótipo pró-regenerativo no local da lesão, o que acarretou em rápida remielinização e maior eficiência do reparo (dados não publicados).

Considerando os resultados positivos sobre a regeneração axonal com a associação do selante de fibrina *BthTL* ao peptídeo de ação mimética ao TNF, e, ainda, considerando que após uma lesão em nervo periférico ocorrem repercussões no microambiente medular, esse trabalho pretende analisar os efeitos dos tratamentos *in loco* sobre o SNC.

2-OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral:

Estudar as alterações medulares após tratamento de lesão de nervo isquiático com a técnica de tubulização associada ao selante de fibrina *BthTL* misturado ou não ao peptídeo mimético de TNF.

2.2- Objetivos específicos:

- Observar os corpos celulares de neurônios motores após lesão do nervo isquiático tubulizado com prótese de silicone preenchida por selante de fibrina com e sem associação ao peptídeo mimético ao TNF;
- Estudar a resposta de células gliais (astrócitos e microglia) na medula após lesão do nervo isquiático tubulizado com prótese de silicone preenchida por selante de fibrina com e sem associação ao peptídeo mimético ao TNF.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados 15 ratos *Wistar* machos e adultos (oito semanas de idade), com peso corporal entre 200 e 250g. Os animais foram obtidos e alojados no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA - UFU), onde ficaram sujeitos a ciclos de luz/escuro de 12 horas, com 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 submetidos, sob efeito de anestesia, à neurotmesa do nervo isquiático esquerdo e foram divididos, no momento da cirurgia, em três grupos experimentais, dependendo da prótese tubular de silicone inserida para reparo da lesão. Assim, foram obtidos 5 animais do grupo tubo vazio (que receberam prótese tubular de silicone vazia), 5 animais do grupo tubo+cola (que receberam prótese tubular de silicone preenchida por selante de fibrina *BthTL*) e 5 animais do grupo tubo+cola+peptídeo (que receberam prótese tubular de silicone preenchida por selante *BthTL* misturado ao peptídeo de ação mimética ao TNF).

3.2- Síntese do selante de fibrina e do peptídeo mimético ao TNF

O selante de fibrina e o peptídeo mimético ao TNF foram doados prontos para testes em nosso laboratório. Portanto, segue resumo breve dos 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 CaCl₂ 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. Os pesquisadores verificaram que os peptídeos 2 e 3 estimularam células em cultura a produzir IL-1β e IL-10, citocinas pró e anti-inflamatórias, respectivamente, tendo o peptídeo 2 uma ação inflamatória intermediária quando comparada aos demais. 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.

3.3- Procedimento cirúrgico para a tubulização

A tubulização foi realizada conforme protocolo descrito por LIANG e colaboradores (2014) com algumas adaptações. A Figura 1 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 sob o microscópio cirúrgico (Figura 1A). Realizada a incisão da pele, a musculatura foi afastada de forma a expor o nervo isquiático (Figura 1B), o qual em seguida sofreu transecção. Após a retração dos cotos, foi introduzida 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* diminuiu o diâmetro interno das próteses tubulares utilizadas nos animais do grupo tubo vazio (diâmetro externo = 2,7mm), optou-se por empregar tubos de maior diâmetro nos grupos tubo+cola e tubo+cola+peptídeo (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 1D), o diâmetro interno dos tubos do grupo tubo+cola e tubo+cola+peptídeo ficou equivalente ao do grupo tubo vazio.

Por fim, os animais tiveram um período de sobrevivência de 45 dias. Após esse tempo, os animais foram eutanasiados para extração da medula espinal para estudo.

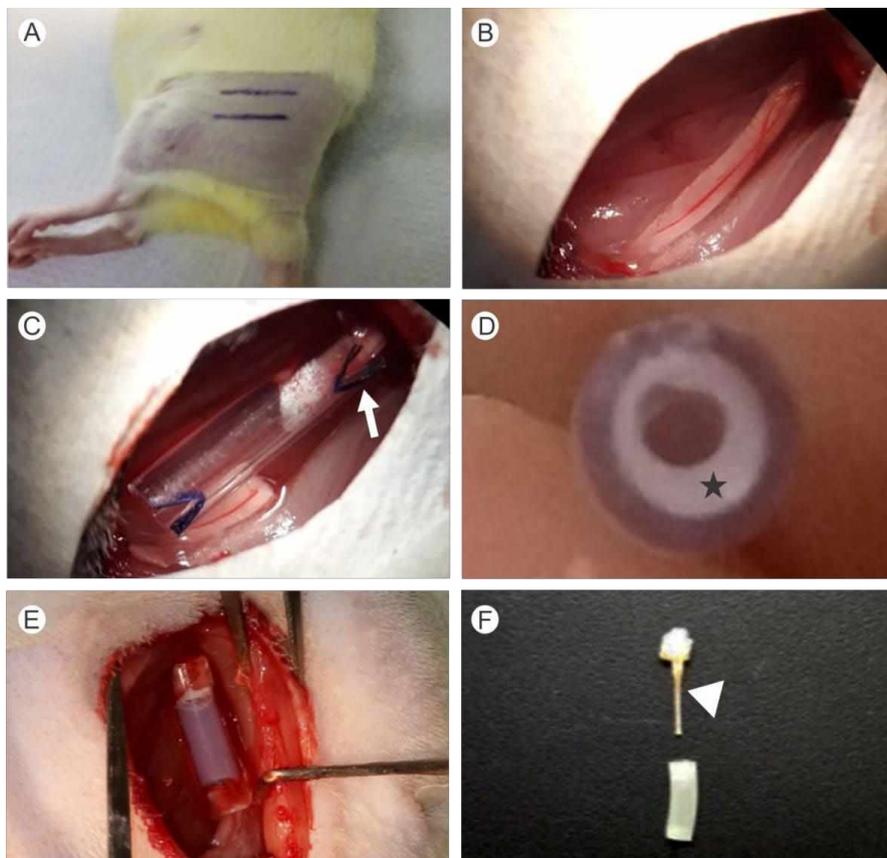


Figura 1: Etapas da cirurgia de tubulização. **A:** Animal colocado em decúbito lateral mostrando margem do fêmur (linha superior) e local da incisão (linha inferior). **B:** Nervo isquiático esquerdo. **C:** Coto proximal inserido em tubo vazio (seta). **D:** Vista superior da prótese tubular preenchida 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).

3.4- Coloração de Nissl e Imunofluorescência

Após 45 dias de sobrevida, os animais foram anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilazina (15mg/kg), via intraperitoneal, sendo em seguida submetidos à toracotomia e perfundidos transcardiacamente, 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, as medulas foram retiradas em toda sua extensão e submetidas à fixação em solução paraformaldeído 4% em PBS 0,1M, pH 7,4, *overnight*, à temperatura ambiente. Passado esse período, os segmentos de nível lombar (regiões de onde emergem as raízes no nervo isquiático, sendo evidenciadas pela curvatura característica) foram dissecados e imersos em solução de etanol 70%. Em seguida, os tecidos sofreram processamento histológico padrão (desidratação em séries crescentes de etanol, clarificação com xilol e inclusão em parafina). Foram obtidas secções de 5 µm em micrótomo (Leica), as quais foram transferidas para lâminas silanizadas e estocadas até o momento da realização da coloração de Nissl e das imunomarcações.

Para a coloração de Nissl, as lâminas foram submetidas a hidratação em xilol e séries decrescentes de etanol. Em seguida imersas em solução Cresyl (1 grama de Cresyl violeta + 100 mL de água destilada + 10 mL de solução ácido acético 10%) por dez minutos à temperatura ambiente, sendo então submetidas a desidratação em séries crescentes de etanol e xilol e montadas com Enthelan. As imagens dos cortes histológicos foram obtidas por meio de microscópio óptico Nikon Tsi acoplado a uma câmera digital sob aumento de 20x. Foram quantificados os neurônios maiores (sabidamente motores) no corno anterior direito e esquerdo de 5 imagens para cada animal de cada um dos grupos, a média aritmética foi calculada e comparada entre os lados e entre os grupos.

Para as imunomarcações, as lâminas foram submetidas despafinizadas e reidratadas em séries decrescentes de etanol, lavagens de dez minutos cada em água destilada e PBS 0,1M pH 7,4 e recuperação antigênica por vinte minutos em tampão citrato pH 6,0 aquecido. Finalizada a recuperação antigênica, foi feito na sequência: uma lavagem com PBS 0,1M pH 7,0 de cinco

minutos; bloqueio de reações inespecíficas por meio da incubação em solução de albumina bovina sérica 5% em PBS 0,1M pH 7,4 (1:1) por uma hora; três lavagens de cinco minutos cada com PBS 0,1M pH 7,4 e incubação do anticorpo primário *overnight* a 4°C. Os anticorpos primários foram utilizados no presente projeto estão listados abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados no presente trabalho e sua respectiva marcação

Anticorpo	Marcação
Camundongo anti-GFAP (1:100, Santa Cruz Biotechnologies)	Proteína Ácida Fibrilar Glial, um tipo de filamento intermediário encontrado principalmente no citoesqueleto de astrócitos, funcionando como um marcador para estas células.
Camundongo anti-Iba-1 (1:300, Wako)	Proteína de ligação a cálcio específica de macrófagos e micróglia

Na sequência, foram realizadas três lavagens, sendo cinco minutos cada, em PBS 0,1M, pH 7,4 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 TiS sob o aumento de 20x. Foram capturadas com câmera digital Opticam duas imagens de cada corte, uma de cada lado no corno anterior da medula, de forma padronizada para todas as amostras. 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.

3.5- Análise estatística

A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism versão 5.03. Foi executado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov a fim de verificar o tipo de distribuição de dados. Os dados obtidos tiveram distribuição não paramétrica, sendo assim, foi executado o teste de Kruskal Wallis com pós teste de Dunn, também foi utilizado o teste de Mann Whitney para comparar lado direito e esquerdo do mesmo animal. Foi considerando um nível de significância de $p < 0,05$ para comparação. Os resultados foram expressos por mediana e interquartil.

4- RESULTADOS

4.1- O uso do selante e do peptídeo no interior da prótese de silicone não modificou o número de neurônios motores no corno anterior da medula

Através da técnica histológica de coloração de Nissl não foram observadas diferenças significativas na contagem de números de neurônios motores íntegros (Figura 2).

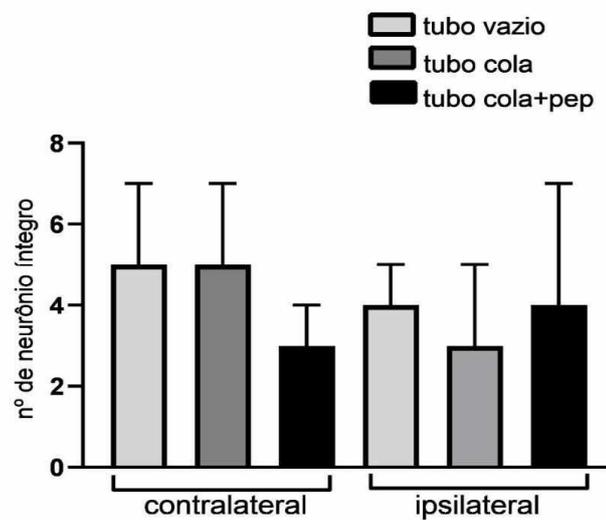
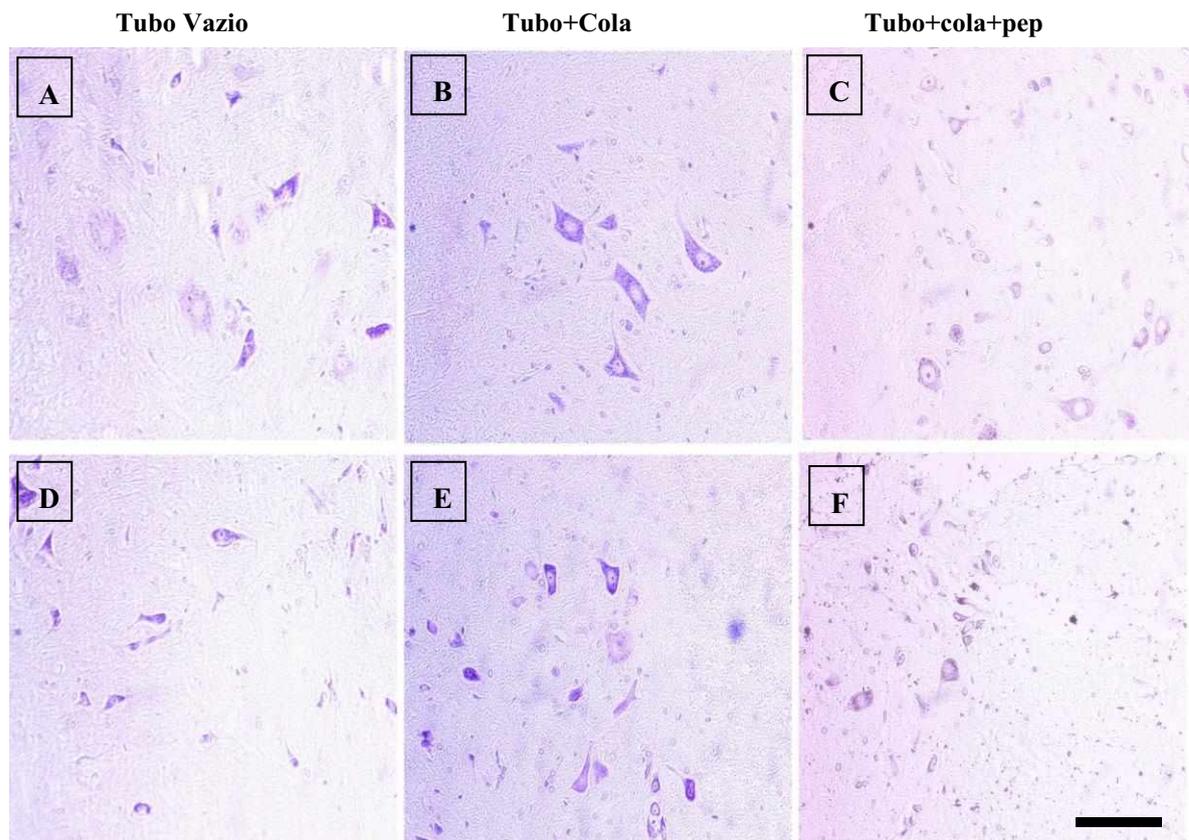


Figura 2: Cortes longitudinais com coloração de Nissl. Corno anterior contralateral lado direito (A-C) e ipsilateral lado esquerdo (D-F). O gráfico mostra mediana e interquartil dos grupos. Teste Kruskal Wallis com pós teste de Dunn. Escala = 50 μ m.

4.2- O uso do selante e do peptídeo no interior da prótese de silicone aparentemente não interfere na reatividade da glia após 45 dias

As imunomarcações tiveram o objetivo de estudar a influência da cola e peptídeo na astrogliose (GFAP) e na microgliose (Iba-1) e no corno anterior da medula. A quantificação das marcações para GFAP não detectaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 3).

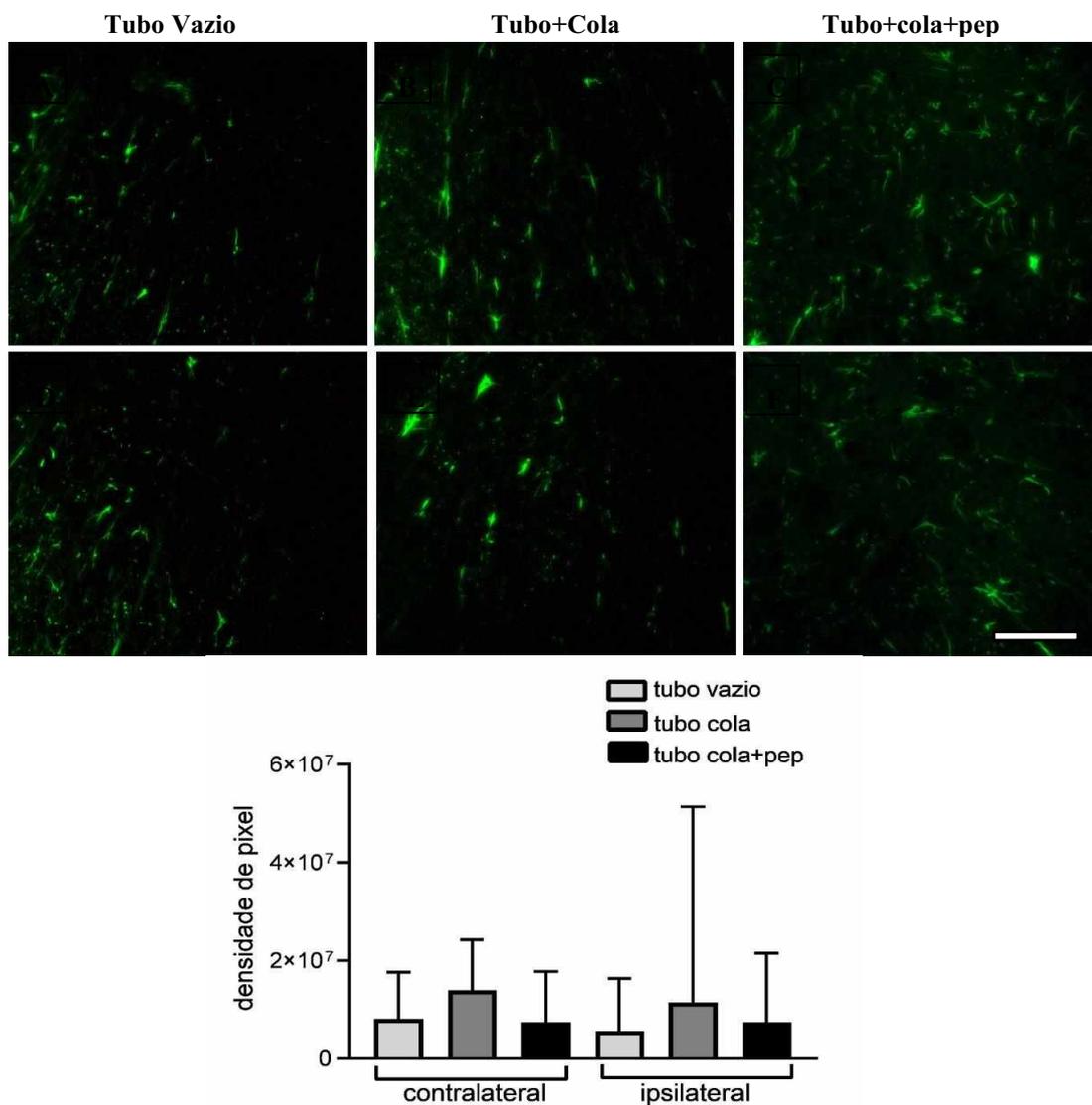


Figura 3: Cortes longitudinais com imunomarcações anti GFAP. Corno anterior contralateral (A-C) e ipsilateral (D-F). O gráfico mostra mediana e interquartil dos grupos. Teste Kruskal Wallis com pós teste de Dunn. Escala = 50 μ m.

Na imunoflorescência para Iba foram observadas diferenças significativas na densidade de pixels entre o grupo tubo+cola de ambos os lados ($p < 0,05$), porém como obtivemos, na quantificação, aumento dos dois lados da medula, provavelmente algum artefato em lâminas desses animais interferiram no processo de quantificação (Figura 4).

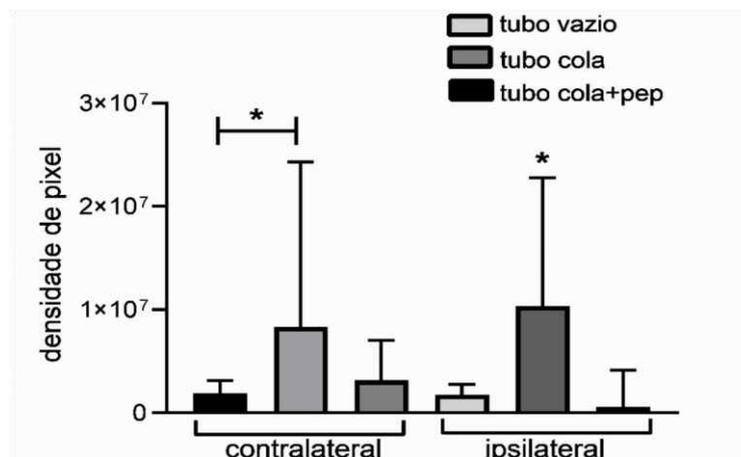
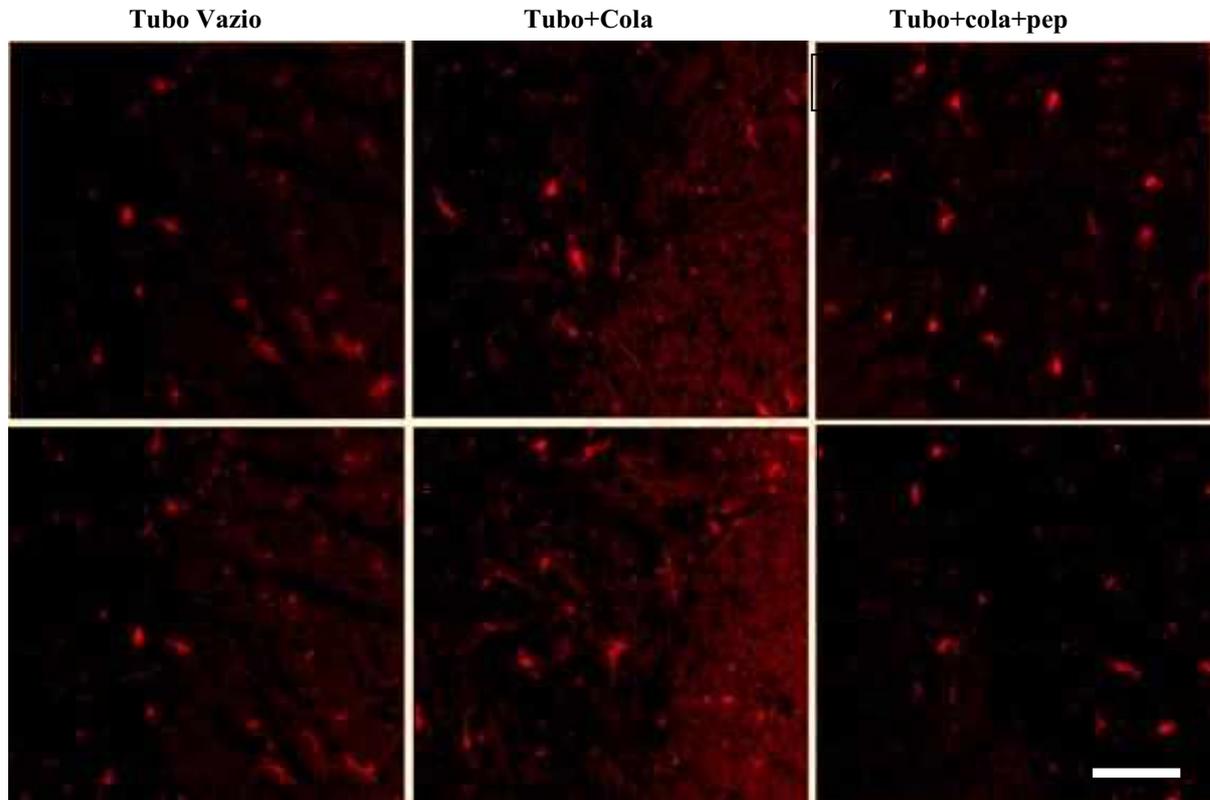


Figura 4: Cortes longitudinais com imunomarcações anti-Iba. Corno anterior contralateral (A-C) e ipsilateral (D-F). O gráfico mostra mediana e interquartil dos grupos. Teste Kruskal Wallis com pós teste de Dunn. Escala = 50 μ m.

5- DISCUSSÃO

Lesões do tipo neurotmesa são as mais graves haja visto que ocorre a secção completa do segmento nervoso. Uma vez que os corpos celulares dos nervos periféricos residem na medula espinal podem haver alterações em nível medular, isto porque os axônios distais ao local da lesão perdem sua conexão com os corpos neuronais (SUN et al., 2018; GROVES et al., 1999). Num trabalho anterior realizado em nosso laboratório foi demonstrado que o selante de fibrina *BthTL* associado ao peptídeo de ação mimética TNF resultou em maior quantidade de células inflamatórias e de células de Schwann com fenótipo pró-regenerativo o que acarretou uma rápida remielinização e maior eficiência de reparo após a secção do nervo isquiático (dados não publicados). Sabendo disto analisamos se a utilização destes materiais poderia acarretar modificações em nível medular.

O uso do selante e do peptídeo no interior da prótese de silicone não modificou o número de neurônios motores no corno anterior da medula assim como também não houve aparentemente interferências na reatividade da glia após 45 dias de sobrevivência, apesar do grupo tubo+cola demonstrar diferenças significativas na densidade de pixels para Iba-1, marcador de micróglia, acreditamos que pelo fato de haver aumento em ambos os lados da medula, algum artefato nas lâminas desses animais como depósito de anticorpo secundário ou até mesmo problemas com a navalha durante a microtomia ou durante o processamento podem ter interferido na quantificação.

Os princípios biológicos dos selantes de fibrina são similares aos da cascata da coagulação, com a formação definitiva de um coágulo de fibrina (ATRAH, 1994). O selante de fibrina foi usado como uma matriz de entrega aumentando a disponibilidade de TNF sendo assim por si próprio não apresenta influência no SNC, como visto nesse trabalho.

Quanto ao efeito do TNF sobre lesões de nervos periféricos, sabe-se que está relacionado com o aumento da fagocitose de debris de mielina devido ao maior recrutamento de macrófagos, o que é extremamente importante para uma regeneração bem-sucedida (YUAN et al., 2012). Adicionalmente, o TNF tem a capacidade de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas e fatores tróficos, exerce seus efeitos através da interação com TNFR1 e TNFR2 e regula uma série de funções celulares críticas como proliferação celular, apoptose, diferenciação celular e necroptose (BASTIEN & LACROIX, 2014; PARAMESWARAN & PATIAL, 2010). Entretanto esse aumento de fatores pró-inflamatórios poderia causar alterações no SNC como apoptose e necroptose de células em nível medular o que não foi observado em nossos resultados.

Diante dos resultados, podemos sugerir que o método de tubulinização usando cola e cola+peptídeo parece não influenciar as respostas do SNC à lesão nervosa periférica dentro do tempo avaliado de 45 dias.

6- CONCLUSÕES

- A quantidade de corpos celulares de neurônios motores íntegros após a lesão do nervo isquiático tubulizados com prótese de silicone preenchida por selante de fibrina com ou sem associação ao peptídeo mimético ao TNF não sofreram alterações significativas.
- A resposta das células gliais na medula após a lesão do nervo isquiático tubulizado com a prótese de silicone preenchida por selante de fibrina com e sem associação ao peptídeo mimético ao TNF não foram aumentadas ou reduzidas.

7- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ASSIS, A.D. **Efeito da angiotensina-(1-7) na regeneração axonal e na plasticidade medular após lesão nervosa periférica.** 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

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

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

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.

BATTISTA, A. F.; LUSSKIN, R. **The Anatomy and Physiology of the Peripheral Nerve.** Foot & Ankle. V.7, p. 65-67, 1986.

BEIROWSKI, B.; ADALBERT, R.; WAGNER, D.; GRUMME, D. S.; ADDICKS, BICAN, O.; MINAGAR, A.; PRUITT, AA. **A medula espinhal.** Neurologic Clinics. v.31, p.2-5, 2013.

BISCOLA, L.P.; ULIAN-BENITEZ, S.; BARBIZAN, R.; CASTRO, M. V.; SPEJO, A.B.; BARRAVIEIRA, B.; OLIVEIRA A.L.R. **Multiple uses of fibrina 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.

CARTAROZZI, L. P.; SPEJO, A. B.; FERREIRA JR, R. S.; BARRAVIEIRA, B.; DUEK, E.; CARVALHO, J. L.; GÓES, A. M.; OLIVEIRA, A. L. R. **Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrina scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization.** Brain Research Bulletin, v.112, p.14-24, 2015.

EKMAN, Laurie Lundy *et al.* Região da Medula Espinal: Segmentos da Medula Espinal. *In:* NEUROCIÊNCIA: **Fundamentos da Reabilitação.** 3º. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2008. cap. 12, p. 250-253. ISBN 13:978-1-4160-2578-8.

GEORGE, E.B., GLASS, J.D., GRIFFIN, J.W.. **Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels.** J. Neurosci. 15, 6445/6452, 1995.

GONÇALVES, T. C. O. **Efeito do Selante de fibrina *BthTL* combinado ao peptídeo de ação mimética ao TNF na regeneração nervosa periférica.** Orientador: Profa. Dra. Renata Graciele Zanon. 2019. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicada) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

GRIFFIN, J.W.; HOFFMAN, P.N. **Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system.** In: Dick PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo J. Peripheral neuropathy, Philadelphia, Ed W.B. Saunders, 3rd ed, p.361-376, 1993.

GROVES, M.J.; NA, S.F.; GIORNETTO, B.; SCARAVILLI, F. **Inibição da apoptose dos neurônios sensoriais e prevenção de perda pela administração de NT-3 após axotomia.** Exp Neurol. p. 284-294, 1999.

GUANABARA KOOGAN LTDA, 2010. cap. 12, p. 410. ISBN 978-85-277-1653-6.

HORIUCHI, T.; MITOMA, H.; HARASHIMA, S.; TSUKAMOTO, H.; SHIMODA, T. **Transmembrane TNF-Alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents.** Rheumatology (Oxford), v. 5, n. 4, p.1215-1228, 2010.

HUDSPETH, S.J. **Principle of Neural Science.** 5ª edição, editora The McGraw Hill Medical, Nova York, Estados Unidos, 2013. ISBN 978-0-07-181001-2.

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.

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, piiE1494, 2016.

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, 2008.

KANDEL, E.R; SHWARTZ, 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.

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.

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.

MALBOUISSON, A.M.B.; GHABRIEL, M.N, ALLT G. **Axonal degeneration in large and small nerve fibres – an electron microscopic and morphometric study.** *J Neurological*, p.307- 318, 1985.

MALBOUISSON, A.M.B.; GHABRIEL, M.N.; ALLT, G. **The nondirectional pattern of axonal changes in Wallerian degeneration: a computer-aided morphometric analysis.** *J Anat*, p. 159- 174, 1984.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; & MCMAHON, S. B. **Role of the Immune system in chronic pain.** *Nature Reviews Neuroscience*. Publishing Group. p.521–532, 2005.

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.

PARAMESWARAN N., PATIAL S. (2010). **Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages.** *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 20 87–103, 2010.

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 Neurichirurgica*, v. 156, n. 8, p. 1577-1590, 2014.

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 na animal model.** *Journal of Hand Surgery (American volume)*, v. 38, n. 5, p. 258, 847-855, 2013.

SCHLAEPFER, W.W., HASLER, M.B.. **Characterisation of the calcium-induced disruption of neurofilaments in rat peripheral nerve.** *Brain Res.* 168, 299/309, 1979.

SILVA, J. R.C. **Mapeamento de peptídeos ligantes ao receptor do Fator de Necrose Tumoral alfa**. 2015.6 60 f. Dissertação (mestrado em Genética e Bioquímica)- Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

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

SULLIVAN, R.; DAILEY, T.; DUNCAN, K.; ABEL, N.; BORLONGSN, 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.

SUN,Z.G.; WEI, W.; LIU, H.W.; MA, J.T.; HUANG , H.T. **Resposta aguda dos neurônios: um evento precoce de morte celular neuronal após lesão do nervo facial**. World Neurosurg. p. 252-257, 2018.

TECIDO NERVOSO: Visão Geral do Sistema Nervoso. *In*: TORTORA, Gerard J.; TSE, R.; KO, J.H. **Nerve Glue for Upper Extremity Reconstruction**. Hand Clinics, v. 28, n. 4, p. 529-140, 2012.

TORTORA, G. J; DERRICKSON, B. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 12º. ed. Rio de Janeiro: DONAT, J.R.; WISNIEWSKY, H.M. **The spatio-temporal pattern of Wallerian degeneration in mammalian peripheral nerves**. Brain Research.v. 53. p. 41-53, 1973.

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.

YUAN, Q.; YANG, H.; CHENG, C.; LI, C.; WU, X.; HUAN, W.; SUN, H.; ZHOU, Z.; WANG, Y.; ZHAO, W.; LU, X.; SHEN, A. **β -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. 158, 2012.

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