



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
ICBIM - INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

RAPHAEL TEIXEIRA BORGES

**EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA BthTL NA REGENERAÇÃO AXONAL E
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

Uberlândia

2019

Raphael Teixeira Borges

EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA BthTL NA REGENERAÇÃO AXONAL E
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Pesquisa monográfica apresentada como trabalho de conclusão de curso, requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, na Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora:

Prof^ª Dr^ª Renata Graciele Zanon

Uberlândia – MG

2019

Agradecimento

Primeiramente quero agradecer a Deus por sempre me dar sabedoria e força para continuar.

Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Renata Zanon, que além de me auxiliar e ensinar no laboratório, também sempre me apoiou e conversou sobre a vida, mostrando outra visão dos dilemas de forma sábia, sendo uma amiga que Deus me deu.

Ao pessoal do laboratório que tanto me ensinou, como o Pedro e o Alex, que foram os primeiros a me acolher e ensinar técnicas do laboratório. A Táríka que fez parte desse projeto e sempre tirou minhas dúvidas com a maior vontade do mundo, sempre disposta a ajudar e explicar!

Além disso, agradeço a todos os professores da UFU que me ajudaram a estar aqui hoje com o conhecimento que tenho e, principalmente me ensinaram a aprender.

Também a todos os autores que constam nas “referências” deste trabalho, ajudando a corroborar a ideia do projeto.

Por último, mas não menos importante agradeço a minha família, minha mãe por ter se sacrificado tanto por nós, acreditado no meu potencial até mais do que eu mesmo, mostrando o que é ser forte e como podemos vencer cada batalha, te admiro e aprendi muito com você.

Minha namorada Natália, por sempre me dar apoio nas horas difíceis, me acompanhou, acreditou e auxiliou em toda esta jornada, além de ter ajudado na correção gramatical desta monografia. Meu irmão João Gabriel que apesar de longe sempre esteve presente e mostrou admiração por mim, isso significa muito.

“The measure of intelligence is the ability to change.”

“Anyone who has never made a mistake has never tried anything new.”

ALBERT EINSTEIN

EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA BthTL NA REGENERAÇÃO AXONAL E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Raphael Teixeira Borges, Renata Graciele Zanon

RESUMO

Frente a uma lesão de nervo periférico, o procedimento empregado apresenta limitação quanto ao tipo e tempo de lesão, não se tendo um resultado positivo referente a recuperação da função. O uso de próteses tubulares que orientam e protegem a área de lesão e a possibilidade de, dentro dessa prótese, se inserir substâncias que atuem de forma positiva no processo de regeneração nervosa é uma perspectiva na clínica atual. Nesse sentido, este trabalho teve o objetivo de estudar o crescimento axonal e as respostas das células de Schwann em nervos comprometidos por transecção total (neurotmese), submetidos ao processo de tubulização (os cotos nervosos são inseridos dentro de uma prótese tubular de silicone) com o uso de um selante de fibrina desenvolvido em nossa Universidade (patente PI-0406273-6), que oferece um arcabouço biológico dentro da prótese que pode favorecer a recuperação axonal. Após 45 dias da lesão, os nervos foram analisados e comparados com grupos controles. Para o estudo foram usadas análises funcionais (motora e sensitiva) e imunofluorescência. Em relação a recuperação motora o presente estudo observou uma melhora ao longo do tempo, porém não obteve melhora significativa comparando os grupos. Nas imunofluorescência observou-se mais presença de fenótipos pró-regenerativos no grupo tubo+cola. A perspectiva é que o trabalho contribuiu com a técnica de reparo e utilização de selante para melhorar/auxiliar a recuperação do nervo periférico. Além disso, incentivam-se mais pesquisas com outras substâncias que possam ter efeito sobre a regeneração e que tenham maior eficiência no aspecto funcional, devolvendo, ao indivíduo comprometido pela lesão, os movimentos e a sensibilidade.

Palavras-chave: células de Schwann, neurotmese, crescimento axonal, selante.

ABSTRACT

In the case of a peripheral nerve injury, the procedure has limitations regarding the type and time of injury, not having a positive result regarding the recovery of the function. The use of tubular prostheses that guide and protect the area of injury and the possibility of inserting substances that act positively into the nerve regeneration process within this prosthesis is a perspective in current practice. In this sense, this paper aimed to study the axonal growth and schwann cell responses in nerves damaged by total transection (neurotmesis), submitted to the tubulization process (the nerve stumps are inserted into a silicone tubular prosthesis) with the use of a fibrin sealant developed at our university (patent pi-0406273-6), which provides a biological framework within the prosthesis that may favor axonal recovery. 45 days after the injury, the nerves were analyzed and compared with control groups. For the study we used functional analysis (motor and sensory) and immunofluorescence. Regarding motor recovery, the present study observed an improvement over time, but did not obtain significant improvement comparing the groups. Immunofluorescences showed more presence of pro-regenerative phenotypes in the tube+sealant group. The perspective is that the work contributed with the repair technique and use of sealant to improve/assist the recovery of the peripheral nerve. In addition, further research with other substances that may have an effect on regeneration and that have greater efficiency in the functional aspect is encouraged, returning movements and sensitivity to the individual affected by the injury.

Key-words: Schwann cells, neurotmesis, axonal growth, sealant.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Processo de tubulização.	13
Figura 2: Aparato e cálculo utilizados para o SFI.	14
Figura 3: Avaliações motora e sensitiva.	17
Figura 4: Cortes longitudinais com imunomarcações anti Iba-1, S100 β e NGFRP75.	18
Figura 5: Cortes longitudinais com imunomarcações anti neurofilamento e anti-GAP-43.	19
Tabela 1: Anticorpos primários utilizados e sua descrição.	15

LISTA DE ABREVIACÕES

CS - Célula de Schwann

DW- degeneração walleriana

IT - Abertura dos dedos intermediários

PL - Comprimento da pegada

SFI - Índice funcional do isquiático

TS - Abertura total dos dedos

Tubo+cola - Grupo que sofreu neurotemese e foi colocado o tubo de silicone com selante de fibrina no interior.

Tubo vazio – Grupo que sofreu neurotemese e foi colocado apenas o tubo de silicone.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Nervos periféricos: função e características estruturais.....	9
1.2 Lesão e regeneração em nervos periféricos	9
1.3 Tubulização.....	10
1.4 Selantes de fibrina.....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Animais e tubulização.....	12
4.2 Análise motora e sensitiva	13
4.3 Imunofluorescência.....	14
4.4 Análise estatística	16
5. RESULTADOS	16
5.1 Recuperação motora e sensitiva.....	16
5.2 Maior atividade das células de Schwann e de macrófagos em nervos regenerados do grupo selante <i>BthTL</i>	17
5.3 Maior expressão de GAP-43 em nervos lesionados	18
6. DISCUSSÃO.....	19
7. CONCLUSÃO	21
8. REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nervos periféricos: função e características estruturais

Os nervos são definidos por feixes de fibras nervosas envolvidas por uma camada de tecido conjuntivo com função de proporcionar a comunicação do Sistema Nervoso Central com a região periférica do corpo, podendo ser órgãos efetores e/ou de sensibilidade, garantindo ao indivíduo executar movimentos, perceber estímulos sensoriais, e a interação com tudo que o cerca (KANDEL et al, 2013). As fibras nervosas podem ser mielinizadas ou não. As fibras mielinizadas são as que possuem um revestimento denominado bainha de mielina produzida pelas células de Schwann (glia do nervo), a qual proporciona isolamento elétrico e entre uma bainha e outra permanece um espaço livre, denominado Nódulo de Ranvier. Com isso, os impulsos nervosos conseguem se propagar de maneira mais rápida. Em contrapartida, as não mielinizadas possuem apenas o revestimento da membrana plasmática das células de Schwann, sendo os impulsos nervosos propagados nessas fibras mais lentos (KANDEL et al, 2013; SIMIONESCU, 2016).

Além das fibras de mielina tem-se o tecido conjuntivo frouxo denominado endoneuro, que nada mais é do que fibroblastos dispersos, fibras colágenas e reticulares sintetizadas pelas células de Schwann. Separando as fibras em fascículos, tem-se o perineuro, formado por camadas concentradas de fibroblastos modificados que se ligam por meio de zônulas de oclusão, o que garante uma proteção contra agentes nocivos. E por último tem-se o epineuro, que reveste um conjunto de fascículos, sendo denso não modelado e tendo como objetivo garantir a proteção, resistência e um pouco de elasticidade (GUYTON & HALL, 2011).

1.2 Lesão e regeneração em nervos periféricos

As lesões de nervos periféricos são relativamente comuns, porém uma recuperação adequada e de sucesso é rara, e devem-se considerar vários fatores, como idade, tamanho da lesão, e, principalmente o nível da lesão. Essas lesões são classificadas em três tipos segundo Seddon (1942), podendo ser neuropraxia, axonotmese e neurotme. Pelo grau de complexidade da lesão temos a neuropraxia que se enquadra em uma lesão leve, com desmielinização, porém sem perda da integridade axonal, podendo levar a perda temporária das funções motoras e sensitivas do nervo. A axonotmese é a lesão que causa dano ao axônio, porém o epineuro e perineuro se mantêm intactos. Já na neurotme ocorre o rompimento total do nervo.

Após uma lesão por esmagamento ou transecção, as fibras distais à lesão sofrem degeneração por meio de um processo conhecido como degeneração walleriana. A degeneração Walleriana. Nessa etapa, começará a degeneração, com a perda do arranjo de mielina das células de Schwann, que adjunto aos macrófagos fagocitarão as fibras do segmento (coto) distal, desconectado, do nervo. Enquanto o coto proximal produz brotos colaterais que irão crescer e seguir substâncias tróficas produzidas pelo órgão denervado (Ide, 1996). No coto proximal do nervo, as fibras degeneram de maneira retrógrada até chegar ao próximo nódulo de Ranvier. Nesses axônios, originam-se cones de crescimento a partir dos quais ocorre a regeneração ao longo das bandas de Büngner. As células de Schwann são fundamentais para a regeneração axonal, uma vez que dão suporte ao crescimento axonal e expressam várias integrinas receptoras de membrana e moléculas neurotróficas (MILNER et al, 1997), além de formar as Bandas de Bungner, estruturas tubulares através das quais crescem os brotos axonais em direção ao órgão denervado (FRISEN, 1997). Lesões próximas ao corpo do neurônio podem levar à morte do corpo celular (GAUDET, POPOVICH, RAMER, 2011; ROTSHENKER, 2011; SULLIVAN et al, 2016).

O tipo de intervenção cirúrgica em casos de neurotmeze 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).

1.3 Tubulização

A tubulização é um método cirúrgico de tratamento de lesões totais do nervo. Esse processo tem como meta ajudar no direcionamento dos axônios durante o processo de regeneração e crescimento, permitindo assim uma melhor difusão de fatores neurotróficos, levando a uma melhor regeneração e recuperação do local afetado. Esse procedimento é realizado através da inserção do coto distal e do proximal em uma prótese tubular, mantendo-se um espaço entre eles, e criando-se um ambiente favorável à regeneração axonal, além de gerar uma proteção às fibras nervosas em regeneração, evitando a formação de neuromas (LUNDBORG et al., 2004; PIERUCCI et al., 2004).

Ao longo dos anos, vários materiais têm sido testados como potenciais candidatos à prótese tubular. Sabe-se que dos condutores artificiais testados, os que mais se destacam são os polímeros de lactato e os tubos de silicone, porém seus benefícios ao processo regenerativo

são limitados pela ausência de uma arquitetura interna que proporcione o crescimento e orientação dos axônios e das células da glia (JOHNSON et al., 2005).

1.4 Selantes de fibrina

No interior de tubos, podem-se adicionar substâncias que permitam um ambiente mais interessante para a regeneração nervosa, dentre eles, destacam-se os selantes de fibrina. São materiais compostos por fibrinogênio e trombina, os quais são combinados apenas no momento da aplicação do produto, resultando numa solução de solidificação rápida que adere ao tecido, auxiliando na cicatrização (ATRAH, 1994). Observa-se que esses materiais auxiliam na quimiotaxia do infiltrado inflamatório durante o reparo de lesões, na melhora em processos de cicatrização de feridas, na redução da perda de sangue e na proteção contra infecções bacterianas (GASPAROTTO et al, 2013; OKUDA et al, 2014).

Os pesquisadores da UFU, 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*) registrada pelo número de patente PI-0406273-6, a uma solução saturada de fibrinogênio bovino. Os pesquisadores afirmaram que o selante em questão permaneceu estável por mais de dez dias e seu tempo de degradação não alterou na presença de íons Ca^{2+} ou aprotinina. Essas características podem permitir o uso da cola produzida 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, 2009; KRAM et al, 1990; OLIVEIRA et al, 2016). A adição de selante de fibrina ao lúmen de próteses tubulares para o reparo de lesões de nervo pode funcionar como uma matriz que proporcionaria a proliferação e orientação de axônios e células de Schwann e, dessa forma, contribuir com o sucesso da regeneração. Tendo em vista o potencial uso de colas de fibrina em neurocirurgia e no reparo de nervos periféricos nosso trabalho traz a proposta de adicionar o selante desenvolvido em nossa Universidade associada à técnica de tubulização após neurotome do nervo isquiático em ratos.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que lesões em nervos periféricos ocorrem com bastante frequência e suas consequências levam a um grande prejuízo ao indivíduo que pode perder a capacidade motora e a sensibilidade, esse estudo tem como proposta testar o uso de condutores nervosos artificiais, junto com o selante de fibrina BthTL, proporcionando a reestruturação do axônio.

Caso comprovado à regeneração axonal e funcional de nervos periféricos através desse método abre-se uma nova alternativa para o tratamento desse tipo de lesão.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do selante de fibrina BthTL na regeneração axonal e recuperação funcional do nervo isquiático após neurotmesa.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a reação das células de Schwann e o crescimento do axônio lesionado após ser tubulizado com prótese de silicone preenchida com selante de fibrina.
- Analisar a recuperação funcional sensitiva e motora do nervo isquiático tubulizado com prótese de silicone preenchida com selante de fibrina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e tubulização

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos jovens (6 a 8 semanas, 200-250g) disponibilizados pelo CBEA. Após anestesia (0,2ml de cetamina e 0,2ml de xilazina, 0,2ml/100g peso corpóreo), os animais foram submetidos à tricotomia da coxa esquerda. Em seguida, colocados em decúbito ventral no microscópio cirúrgico. A pele foi incisada e, afastando-se a musculatura, o nervo isquiático exposto e transeccionado. Após retração dos cotos, estes foram introduzidos e fixados no interior de um tubo de silicone deixando-se um espaço de 4mm entre os cotos. Encerrados os procedimentos de tubulização, o plano muscular foi retornado e a pele suturada (Figura 1). Os animais foram mantidos em biotério por um período de 45 dias, recebendo ração e água a vontade, em ciclo de claro/escuro de 12h.

Esses animais foram divididos em dois grupos de 10 animais cada, sendo o primeiro o grupo controle, que sofreu a neurotmesa e adição do tubo de silicone. Enquanto os outros 10 animais além da neurotmesa e o tubo de silicone receberam os tubos com o selante de fibrina. Após os 45 dias os animais foram novamente anestesiados e eutanasiados através de perfusão transcardíaca com solução salina tamponada (50 ml de tampão fosfato com 0,9% de NaCl 0,1M, pH 7,40) e solução fixadora (50ml de formaldeído 3,7%). Após a aplicação, foi retirada a parte do nervo isquiático de ambos os lados para comparação da regeneração em microscópio para leitura da imunofluorescência.

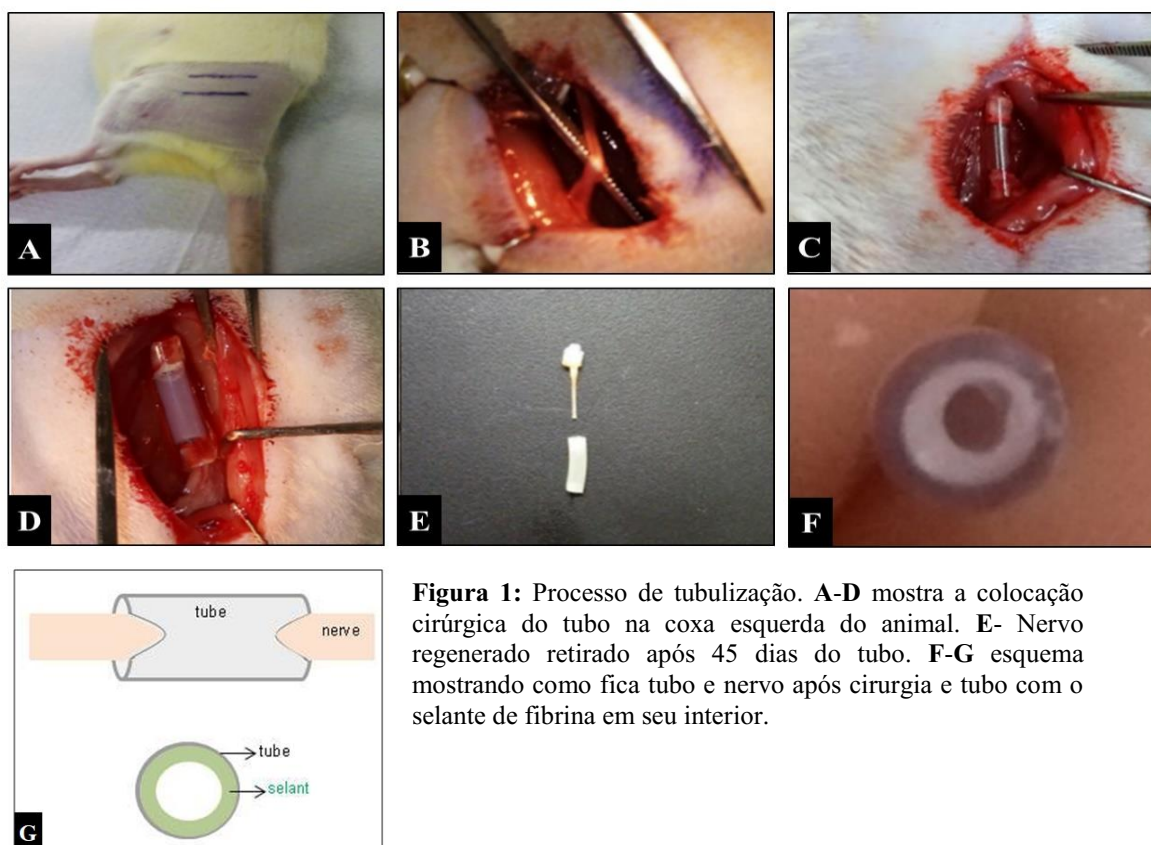


Figura 1: Processo de tubulização. A-D mostra a colocação cirúrgica do tubo na coxa esquerda do animal. E- Nervo regenerado retirado após 45 dias do tubo. F-G esquema mostrando como fica tubo e nervo após cirurgia e tubo com o selante de fibrina em seu interior.

4.2 Análise motora e sensitiva

Para a análise motora utilizou-se o Índice Funcional do Isquiático (SFI), e 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). Nesse sentido, os animais foram treinados uma semana antes da cirurgia a caminhar no aparato construído para a análise funcional (Figura 2A e 2B), 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 2C), 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 2D).

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.

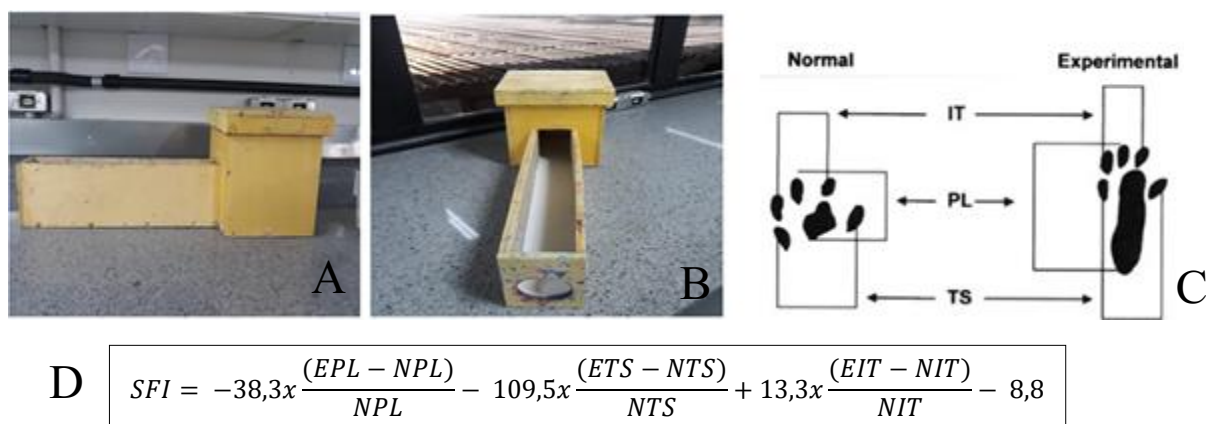


Figura 2: Aparato e cálculo utilizados para o SFI. **A e B-** Aparato utilizado para o teste motor. **C-** Esquema das medidas realizadas após obtenção da impressão plantar das patas normal e lesionada. **D-** Fórmula do índice funcional do isquiático (SFI). EPL: comprimento da pegada no lado lesionado. 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

O uso de filamentos de von Frey (von Frey, 1896) é um método para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico bastante utilizado clinicamente. Para o teste, a ponteira é aplicada em ângulo reto na região central da pata traseira do animal sob pressão crescente, sendo assim ao sentir a dor o animal tem o reflexo de retirada da pata seguida de sacudidas dela. Ao notar tal resposta o estímulo é cessado. A intensidade de hiperalgesia é quantificada pela variação da pressão aplicada, obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 hora) do valor de reação. Esse procedimento foi realizado três dias antes do procedimento cirúrgico, e após, semanalmente.

4.3 Imunofluorescência

Após os 45 dias de sobrevida do animal e o período de fixação do nervo, o material passou por desidratação em sacarose 20% e foi incluído em Tissue-Tek (Miles Inc, USA) e congelado a -40°C em isopentano resfriado em nitrogênio líquido. Dos blocos congelados com o material, foram obtidos cortes histológicos longitudinais e transversais dos nervos em

criostato (-25°C, Microm, Heidelberg, Germany) com espessura de 10 µm. As secções foram então transferidas para lâminas gelatinizadas previamente climatizadas. As lâminas prontas, contendo os cortes histológicos de nervo, foram imersas e lavadas por três vezes em PBS 0,01M. Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com 150µl de solução de albumina bovina 5% em PBS 0,01M, pH 7,4 por 1h. Após este período, os anticorpos primários foram aplicados, com período de incubação de 18 a 24h sob temperatura de 4°C em câmara úmida. Os anticorpos primários empregados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados e sua descrição	
Camundongo anti-neurofilamento (1:200, Sigma)	Proteína do citoesqueleto de axônios
Coelho anti-S100 beta (1:200, Santa Cruz)	Proteína de receptor cálcio dependente presente em células de Schwann
Coelho anti-NGFR-p75(1:200, Santa Cruz)	Receptor de fator de crescimento de nervo (NGF) produzido pela célula de Schwann
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 micróglia

Em sequência à primeira incubação, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01M e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com partícula fluorescente (Alexa Fluor 488 ou 594, Jackson Laboratories) por 1h protegidos da luz. Os espécimes foram lavados em PBS 0,01M e montados com lamínula em glicerol/PBS (1:1) contendo DAPI (4'-6'-diamino-2-fenil-indol) marcador citoquímico de núcleo. O material foi observado e documentado utilizando-se um microscópio de fluorescência (TS-100, Nikon) acoplado à câmera fotográfica digital utilizando-se os filtros para fluoresceína (488nm) e rodamina (594nm). Sendo capturada uma imagem de cada nervo, esquerdo e direito, com objetiva de 20x, para cada animal. As imagens dos nervos foram analisadas qualitativamente e quantitativamente com o Software ImageJ para densidade de pixel e comparado com o grupo controle (tubo vazio).

4.4 Análise estatística

Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.0, no qual foi executado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov a fim de verificar o tipo de distribuição de dados, resultando na escolha específica de testes estáticos considerando nível de significância de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Recuperação motora e sensitiva

Após duas semanas do procedimento cirúrgico, iniciou-se a análise motora e sensitiva, por meio do Índice Funcional do Isquiático (SFI) e do Von Frey respectivamente. Tendo objetivo de acompanhar a melhora dos animais, esperando assim diminuir a distância PL, IT e TS, ou seja, o andar do animal ficar mais semelhante ao normal, voltando ao valor mais próximo de SFI antes da lesão e, aumentando a sensibilidade ao longo do tempo.

Os resultados obtidos do SFI (Figura 3A) evidenciaram que não houve diferença estatística na melhora motora quando comparado o grupo tubo vazio com o tubo+cola, porém, houve melhora ao longo dos 45 dias após tratamento ao se analisar cada grupo individualmente. Comparado esses dados pós-lesão com as análises feitas do SFI antes da lesão (av0), notou-se que não se obteve uma recuperação total da integridade da função.

Já em relação à análise sensitiva Von Frey, notou-se que o grupo tubo vazio apresentou maior limiar de nocicepção nas patas, ou seja, esses animais precisaram receber mais carga para realizar o reflexo de retirada da pata em comparação ao grupo tubo+cola ($p < 0,05$). Essas observações mostram que o grupo contendo selante sentiu a pressão aplicada com menos carga, mostrando, portanto, maior sensibilidade na pata lesionada.

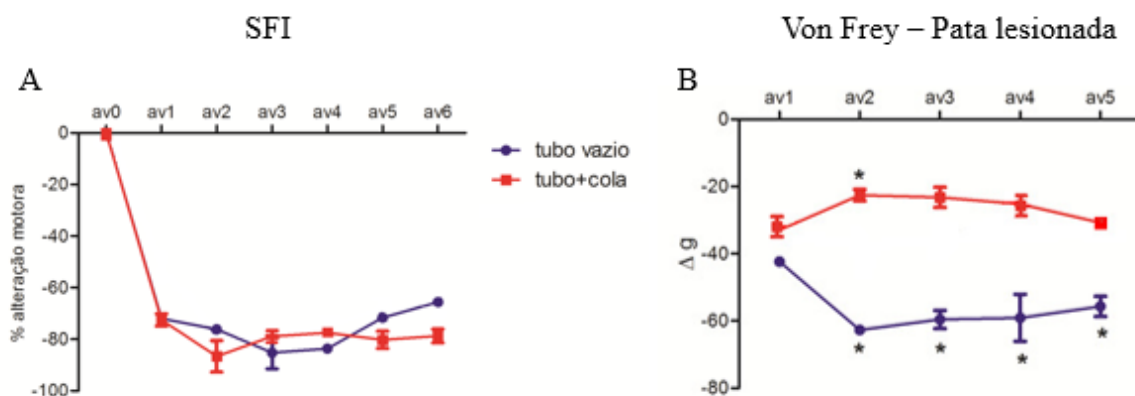


Figura 3: Avaliações motora e sensitiva. **A-** SFI. Zero (0) indica a função do nervo íntegro. As demais avaliações (av) foram realizadas semanalmente durante o período de sobrevivência dos animais dos grupos tubo vazio (linha azul), tubo+cola (linha vermelha). Não houve diferença nas avaliações motoras em nenhum dos grupos durante todo o período de sobrevivência. Teste ANOVA *one way* com pós-teste de Newman-Keuls. (* = $p < 0,05$). **B-** Medidas do Von Frey eletrônico para as patas lesionada tubo vazio e tubo+cola. Grupo tubo+cola (linha vermelha) apresentou menor limiar de nocicepção quando comparado ao tubo vazio (linha azul). Teste ANOVA *one way* com pós-teste de Newman-Keuls. (* = $p < 0,05$).

5.2 Maior atividade das células de Schwann e de macrófagos em nervos regenerados do grupo selante *BthTL*

Foram realizadas imunomarcações para análise de macrófagos (Iba-1), da atividade da CS (S100 β) e fenótipo pró-regenerativos (NGFRp75) das CS. As médias dos grupos foram plotadas em gráfico de barras e comparadas estatisticamente (Figura 4). A análise das imunomarcações para Iba-1 mostrou maior presença de macrófagos nos nervos regenerados quando comparados ao nervo íntegro, o que era esperado. O grupo tubo+cola mostrou maior quantidade de Iba-1, ou seja, houve mais presença de macrófagos. As CS mostraram uma atividade levemente mais elevada ($p = 0,09$) nos nervos lesionados, com maior expressão de S100 β em relação ao nervo íntegro. No entanto, a grupo tubo+cola, apresentou maior expressão de NGFRp75, indicando CS trabalhando em favor da regeneração do nervo, comparando ao grupo tubo vazio e controle.

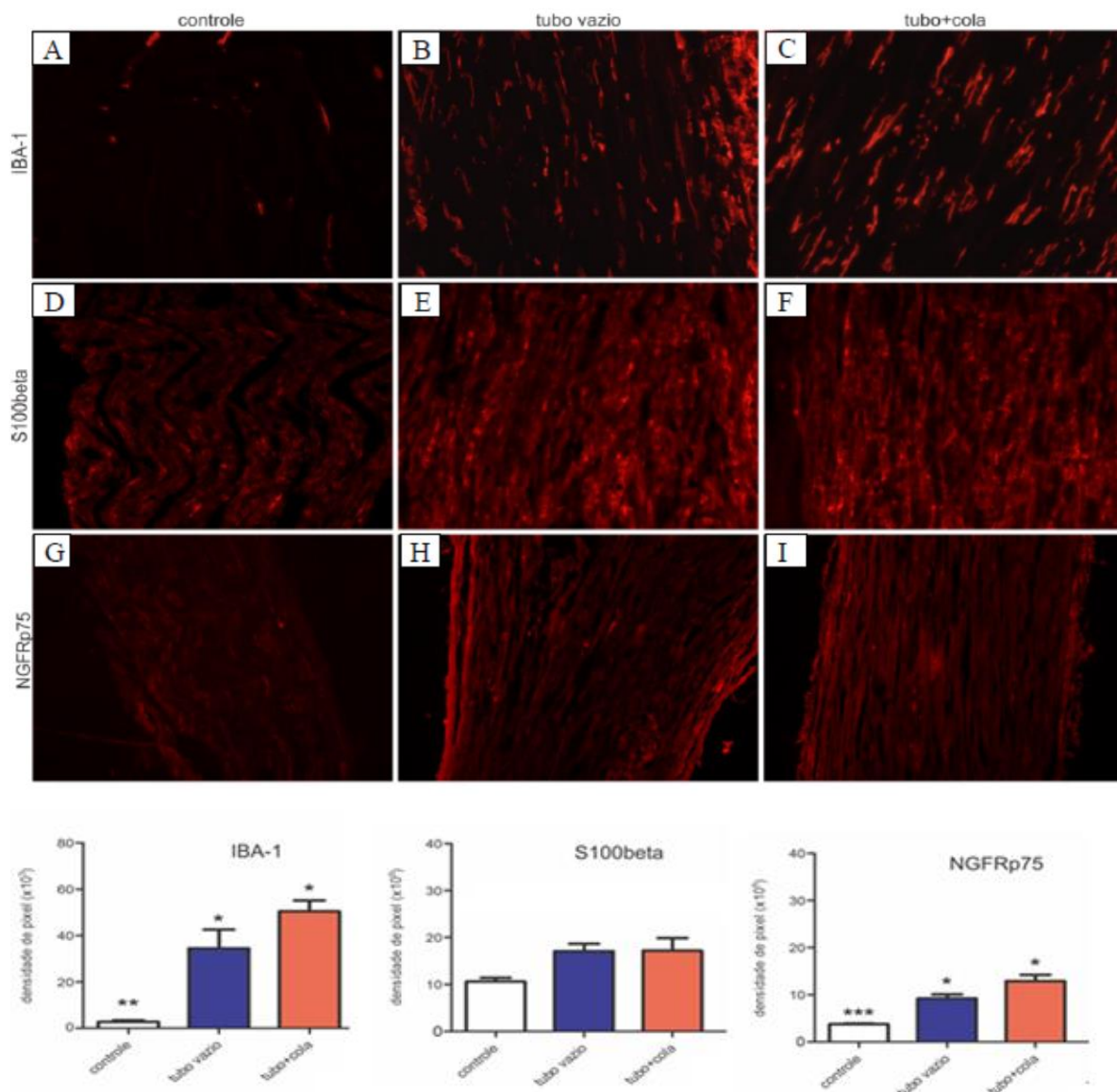


Figura 4: Cortes longitudinais com imunomarcações anti Iba-1 (A-C), S100β (D-F) e NGFRp75 (G-I) em nervos íntegros (controle - barra branca) e regenerados (tubo vazio - barra azul; tubo+cola - barra laranja). Gráficos (linha inferior) mostrando média, erro padrão e comparação estatística entre os grupos. Teste ANOVA *one way* com pós-teste de Newman-Keuls. *** = $p < 0,001$ e * = $p < 0,05$. Escala = 100 μm.

5.3 Maior expressão de GAP-43 em nervos lesionados

Observou-se uma maior expressão de Gap-43 nos nervos que sofreram a lesão, o que era esperado uma vez que a proteína GAP-43 está presente em axônios em crescimento, em regiões específicas denominadas cones de crescimento. Em relação ao GAP-43, as imunomarcações nos segmentos regenerados, notou-se aproximadamente o dobro de expressão em nervos do grupo tubo vazio em comparação ao tubo com cola. Portanto, maior presença de cones de crescimento em seus axônios.

Para avaliar a disposição dos axônios no nervo foi utilizado o anti-neurofilamento, no nervo íntegro observaram-se axônios em zigue-zague (Figura 5 A e D), sendo esse um padrão de normalidade. Já, após a lesão, os axônios começam a crescer em linha reta dentro das bandas de Büngner (Figura 5 B, C, E e F). Nesse sentido, na imunomarcção anti-neurofilamento realizou-se uma análise qualitativa comparativa, em que foi observada a presença de alinhamento e espaços entre os axônios. Dessa forma, a organização 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 imunomarcadas por neurofilamento (setas).

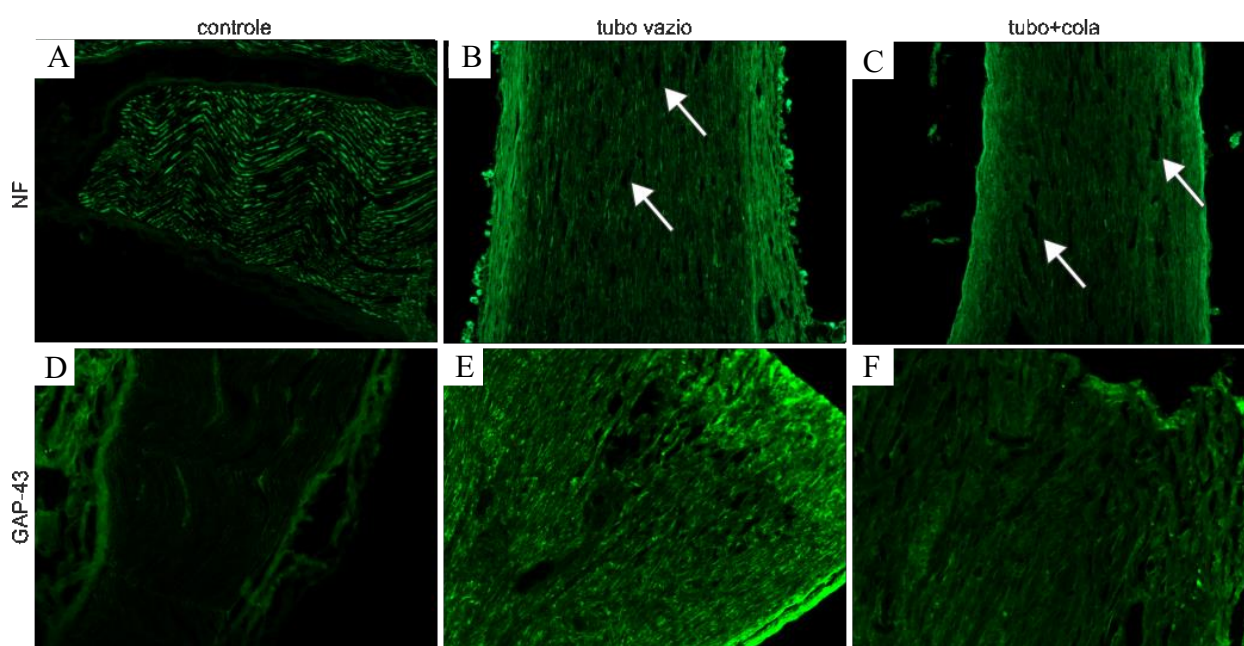


Figura 5: Cortes longitudinais com imunomarcações anti neurofilamento (A-C) e anti-GAP-43 (D-F) em nervos íntegros (controle-barra branca) e regenerados (tubo vazio-barra azul, tubo+cola- barra laranja). Setas indicam espaços entre axônios em crescimento. Gráfico (**linha inferior**) mostrando média, 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 μm .

6. DISCUSSÃO

Para as lesões do nervo periférico do tipo neurotmese, o reparo é realizado por meio cirúrgico, sendo a mais comum sutura do epineuro distal com o proximal, no entanto, tendo 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 estabelecidas (PANAGOPOULOS, MEGALOIKONOMOS E MAVROGENIS, 2017; RICCIO et al, 2018). Neste trabalho, foram utilizados tubos de silicone preenchidos por selante de fibrina para reparo de nervo isquiático seccionado. Não foi possível notar recuperação motora, porém observou maior sensibilidade no grupo com selante de fibrina no interior do tubo. Sendo as fibras nervosas sensitivas mais finas e, algumas, não mielinizadas, a recuperação estrutural e funcional dessas levam um menor tempo em relação às fibras motoras, mais grossas e mielínicas. O que pode explicar o resultado obtido em relação às avaliações funcionais. Adicionalmente, buscou-se avaliar a qualidade do processo regenerativo analisando, para tanto, a presença de CS e de macrófagos nos nervos; o comportamento das CS e o crescimento axonal.

Durante a primeira semana após a injúria, as CS participam ativamente da retirada de debris de mielina e de restos axonais. Essa atividade é de extrema importância para a posterior regeneração axonal, visto que os debris de mielina contêm glicoproteína associada à mielina 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). Os macrófagos, então, chegam ao local da lesão após 3 a 5 dias do início da degeneração Walleriana e alcançam um pico na porção distal aproximadamente 15 dias após a injúria, persistindo no local da lesão ao longo do processo de regeneração (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. Neste 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*. Esses resultados em conjunto mostraram que o selante *BthTL* proporciona maior resposta das CS frente à lesão e aumento da presença de macrófagos.

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 nos dois grupos (tubo vazio e tubo+cola) quando comparado aos nervos íntegros. A maior expressão de proteína GAP-43 em segmentos regenerados do grupo tubo cola evidencia uma maior quantidade de cones de crescimento e, portanto, maior frequência de ramos axonais em alongação nesse grupo quando comparado ao nervo íntegro. Porém o tubo vazio apresentou ainda mais expressão de GAP-43 do que o tubo+cola o que foi uma surpresa, uma vez que se esperava um maior aporte de fatores tróficos no grupo tubo+cola já que foi o grupo que mostrou maior presença de CS pró-regenerativas.

Allodi e colaboradores (2012) afirmaram que ao longo do processo de alongação 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. 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 cones de crescimento observado pela maior expressão de GAP-43 pode não indicar regeneração mais eficiente, mas pode, por outro lado, indicar um estágio mais atrasado do processo regenerativo, anterior à maturação e mielinização axonal.

7. CONCLUSÃO

A análise conjunta dos resultados, por fim, mostra que o selante *BthTL* provocou maior ativação de CS e recrutamento de macrófagos, o que pode ter sido positivo para o processo de regeneração nervosa periférica, com aceleração do processo. Todavia, os dados da análise sensitiva e motora possuem limitações, sendo ideal realizar mais testes em aparelho mais sensível, como substituir o SFI manual que foi utilizado por um eletrônico. Além disso, os testes funcionais talvez precisem de maior tempo de análise, maior que 45 dias usados no presente trabalho, uma vez que outros trabalhos que usaram metodologia semelhante mostraram um retorno funcional somente após 60 dias pós-lesão (IMAN et al, 2017; Pestana et al., 2018).

8. 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.
- 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*.
- 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.
- COLOMÉ, L. M. *et al.* Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.9, dez, 2008.
- CUNHA TM, VERRI WA JR, VIVANCOS GG, MOREIRA IF, REIS S, PARADA CA, CUNHA FQ, FERREIRA SH. *An electronic pressure-meter nociception paw test for mice*. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Mar;37(3):401-7.
- 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.
- 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.
- FRISEN J. 1997. Determinants of axonal regeneration. *Histol. Histopathol.* 12(3): 857-68.
- GUYTON & HALL: *Tratado de fisiologia médica*. 12ª Ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2011.
- IDE, C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res*, v. 25, n.2, p.101-121, 1996.
- 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.
- JENSEN K, ANDERSEN HO, OLESEN J, LINDBLOM U. (1986) *Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer*. *Pain*. 25, 313-323.

- 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.
- LUNDBORG, G; Rosen, L; Dahlin, L; Holmberg, J; Rosen, I. 2004. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J. Hand Surg.* 29(2): 100-107.
- LUNDBORG, G. 1993. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. *J. Hand Ther.* 6(3): 179-188.
- 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.
- MAYHEW, TM & Sharma, AK. 1984. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J. Anat.* 139(Pt 1): 59-66.
- MILNER, R; Wilby, M; Nishimura, S; Boylen, K; Edwards, G; Fawcett, J; Streuli, C; Pytela, R; French-Constant, C. 1997. Division of labor of Schwann cell integrins during migration on peripheral nerve extracellular matrix ligands. *Dev. Biol.* 185(2): 215-228.
- MOLLER KA, JOHANSSON B, BERGE OG. (1998) *Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer*. *J Neurosci Methods*, 84, 41-47.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

TSE, R.; KO, J. H. Nerve Glue for Upper Extremity Reconstruction. *Hand Clinics*, v. 28, n. 4, p. 529-140, 2012.

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.

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.

VIVANCOS GG, VERRI WA JR, CUNHA TM, SCHIVO IR, PARADA CA, CUNHA FQ, FERREIRA SH. *An electronic pressure-meter nociception paw test for rats*. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Mar;37(3):391-9.

WAXMAN, S. G. Determinants of conduction velocity in myelinated nerve fibers. *Muscle Nerve*, v. 3, n. 2, p. 141-150, 1980.