



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

**Natália Perussi Biscola**

**Efeitos neuroprotetor e regenerativo do  
selante de fibrina derivado da peçonha de  
serpente combinado com células tronco  
mononucleares após reparo do nervo  
isquiático de ratos neonatos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para  
obtenção do título de Doutora em Doenças  
Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Barraviera  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

**Botucatu  
2016**

Natália Perussi Biscola

Efeitos neuroprotetor e regenerativo do selante de fibrina derivado da peçonha de serpente combinado com células tronco mononucleares após reparo do nervo isquiático de ratos neonatos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Barraviera  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Botucatu  
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Biscola, Natalia Perussi.

Efeitos neuroprotetor e regenerativo do selante de fibrina derivado da peçonha de serpente combinado com células tronco mononucleares após reparo do nervo isquiático de ratos neonatos / Natalia Perussi Biscola. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Benedito Barraviera  
Coorientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Capes: 20601000

1. Regeneração nervosa. 2. Adesivo tecidual de fibrina.  
3. Axotomia. 4. Nervo isquiático. 5. Nervos. 6. Suturas.

Palavras-chave: Axotomia ; Nervo isquiático; Neurorrafia;  
Regeneração nervosa; Selante de fibrina.

# *Dedicatória*

*À minha avó Rosa, aos meus pais, Wili e Carmo, e ao meu noivo, Eduardo.  
Vocês são minha maior fonte de inspiração.*



# Agradecimentos

*Ao meu orientador Prof Dr Benedito Barraviera, pelos 8 anos de confiança e colaboração, desde a minha iniciação científica, pela orientação, paciência, amizade e pelo grande auxílio com a parte burocrática, principalmente quando estava no exterior, durante o doutorado sanduíche. Obrigada por me acalmar nos momentos em que ficava ansiosa, desde a primeira apresentação que fiz em uma reunião no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), trazendo um copo de água para que eu conseguisse prosseguir e pelo apoio de sempre. Agradeço ainda, pelo incentivo para o desenvolvimento de estágio no exterior e pela oportunidade de colaboração com o Prof Dr Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira. Sou uma profissional muito melhor com a ajuda que tive do senhor.*

*Ao meu co-orientador Prof Dr Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, pela confiança, paciência, amizade e, principalmente pela orientação e disposição em compartilhar suas experiências profissionais, as quais foram e sempre serão de grande importância para as conquistas das minhas. Agradeço imensamente pela oportunidade de trabalhar em seu renomado Laboratório, pelo acolhimento e por toda autonomia e confiança depositadas em mim, para o desenvolvimento do meu projeto. Agradeço também pela oportunidade, incentivo e apoio para a colaboração com o Prof Dr Leif Havton, da University of California (UCLA), Los Angeles, Estados Unidos, onde realizei estágio durante uma parte do doutorado.*

*Ao Prof Dr Rui Seabra Ferreira Junior, que acreditou em minha capacidade desde a primeira reunião que tivemos, quando fui solicitar estágio no CEVAP, durante a graduação, me orientando no projeto de Iniciação Científica. Obrigada pela oportunidade de aprender a trabalhar em colaboração com diversas áreas de conhecimento e pelos momentos sérios e descontraídos nos trabalhos desenvolvidos em campo. Sua orientação e amizade foram muito importantes para meu crescimento profissional e pessoal.*

*Ao Prof Dr Leif Havton e sua equipe (Arthi, Harriet, Rebecca e Marcus), por me receberem em seu Laboratório, durante o desenvolvimento do meu trabalho no exterior, principalmente à Birgitta Sjostrand, por todo o apoio e suporte recebidos.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Almicar Parada e os alunos do Laboratório da Neurobiologia da Dor (IB/UNICAMP), pelos ensinamentos e auxílios.*

*Aos meus pais, Wili e Carmo, que sempre me apoiaram incondicionalmente e continuam me incentivando na busca dos caminhos que eu escolho. Por terem me criado com tanto amor e dedicação, passando por cima de todas as dificuldades, para eu realizar meu sonho. Essa conquista é nossa! Amo vocês!*

*À minha avó Rosa, que sempre me apoiou e mostrou como ser forte nos momentos difíceis que enfrentamos e por todo seu amor. Meu exemplo de mulher guerreira e determinada. Te amo!*

*Ao meu noivo e amigo, Eduardo, que sempre esteve ao meu lado, desde a graduação, me*

*incentivando, apoiando e superando junto comigo todas as dificuldades e obstáculos que surgiram no caminho. Obrigada pelo seu amor, cuidado e companheirismo. Agradeço por sempre estar perto, mesmo estando longe e pela pessoa maravilhosa que é. Você é muito importante para mim. Amo você!*

*Ao meu irmão, cunhada e querido sobrinho, pelos divertimentos e amizade.*

*Aos meus tios Rosinha e Marco, pela amizade, carinho e ajuda que me deram para que eu alcançasse meus objetivos.*

*Aos meus tios Janice Rodrigues Perussi e Sergio Perussi Filho e sua filha Livia Rodrigues Perussi Valverde, que são parte da minha inspiração para ser pesquisadora.*

*À toda a minha família, principalmente para as minhas primas Gabi, Paty, Camila, Marina, Mariana, Marília e Silvinha.*

*À minha futura família Saad, principalmente a Fabiana, Reginaldo e Gabriel, que me acolheram em Campinas e pelo apoio e diversão juntos.*

*Às minhas grandes amigas, que são parte da família, Suelly e Sheila, que sempre me apoiaram e me ajudaram com muito carinho, diversão, moradia e dividindo emoções.*

*À minha amiga Daniela Fossato, pelos ensinamentos profissionais e confiança, pela hospedagem em sua casa diversas vezes, pelas deliciosas comidas que fez para mim, conversas e diversão juntas.*

*À minha amiga Michelle Campagner, que é um exemplo de profissional, de amor ao trabalho, pela ajuda e pela diversão juntas. Sinto muitas saudades de você.*

*Aos meus amigos Vivian Scalon Peres, Karen Tasca e Renato Souza, por compartilharem momentos divertidos, me receberem em suas casas e por toda a ajuda.*

*À minha amiga Vivian Zeraik (Bigode), por todo apoio, preocupação e carinho durante esses anos. Você é especial para mim, bela.*

*Aos amigos de graduação Julia, Vivian, Sheila, Danilo, Daniellé, Pedro e Fernanda pela amizade que ainda temos e cultivamos, mesmo estando longe.*

*Aos amigos de Botucatu, Renato, Thales, Bruno, Thiago e Vinicius, pelos momentos divertidos e amizade.*

*À minha amiga Luciana Cartarozzi, pela ajuda com a análise estatística e pela amizade.*

*Às minhas amigas especiais, Petra e Gabi (Belugas), pela amizade, desabafos, passeios e jantinhas especiais.*

*Às amigas e companheiras de Campinas, Carol, Rachel, Lays, Vanessa, Fabiane, Thuanny, Priscila e Aninha, por conviverem comigo todos esses anos e me proporcionarem momentos únicos e*

*experiências maravilhosas.*

*Aos amigos Teri, Laura, Jacque, Laila, Max, Petra, James, Lais, Bianca, Pam e Jana pela amizade, apoio, dedicação e diversão juntos, durante meu estágio no exterior.*

*A todos os amigos e profissionais que trabalham ou trabalharam no CEVAP, principalmente à Luciana, Priscila, Bel, Paty, Aline, Airton, Denis, Renato, Roberta, Fausto e Gustavo pela ajuda científica e amizade.*

*Aos amigos do Laboratório de Regeneração Nervosa da UNICAMP, André, Aline, Sheila, Roberta, Camila, Gustavo, Rodrigo, Danielle, Luciana, Gabriela, Suzana, Matheus, Gleidy, Kyl, Mateuzinho, Juliana, Patricia, Sergiy, Simone, Marta, Greice, Raphael, Roya, Julio, Giuliano e Gabriel por me auxiliarem e discutirem ideias comigo e também pela diversão e cafézinhos.*

*Aos funcionários do CEVAP, Juliana, Selma, Granieri, Marcos, Sheila, Sandra, Dirce, Sérgio e Jéssica pelas colaborações e descontrações.*

*À Letícia, Marli e Bruna, secretárias do CEVAP e do Departamento de Doenças Tropicais da FMB/UNESP, pela paciência e grande ajuda que me deram durante o meu doutorado.*

*Aos técnicos de laboratório da UNICAMP, Marquinho e Nori, pelo auxílio nos serviços de rotina para a realização dos experimentos.*

*Ao pessoal do laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, Stella, Adriane e Ana, pela ajuda e atenção com as técnicas de microscopia.*

*À FAPESP, pelo apoio financeiro durante o doutorado e também durante o estágio no exterior (bolsa BEPE).*

*Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

## *Epígrafe*

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos. ”*

*Isaac Newton*

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| Resumo .....  | 1  |
| Abstract .....  | 2  |
| Lista de abreviaturas .....   | 3  |
| Lista de figuras .....  | 3  |
| Lista de tabelas .....  | 11 |
| 1. Introdução .....   | 12 |
| 2. Justificativa .....  | 17 |
| 3. Objetivos .....  | 18 |
| 3.1. Objetivo Geral .....   | 18 |
| 3.2. Objetivos específicos .....  | 18 |
| 4. Material e Métodos .....   | 19 |
| 4.1. Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal.....  | 19 |
| 4.1.2. Animais.....   | 19 |
| 4.1.3. Delineamento experimental .....  | 20 |
| 4.2. Obtenção do selante de fibrina.....  | 21 |
| 4.2.1. Obtenção do selante de fibrina derivado da peçonha de serpente.....  | 21 |
| 4.2.2. Obtenção do selante de fibrina comercial .....   | 22 |
| 4.3. Obtenção das células tronco mononucleares (CTMMO) .....  | 22 |
| 4.3.1. Extração das células tronco derivadas da medula óssea.....   | 22 |
| 4.3.2. Isolamento das células mononucleares .....   | 22 |
| 4.3.3. Ensaio de viabilidade celular.....   | 22 |
| 4.4 Caracterização das células tronco mononucleares .....   | 23 |
| 4.4.1. Análise fenotípica das CTMMO por citometria de fluxo.....  | 23 |
| 4.5. Procedimento cirúrgico para transecção do nervo isquiático .....   | 24 |
| 4.6. Sobrevivência neuronal.....  | 25 |
| 4.7. Imunoistoquímica para detecção e quantificação de sinaptofisina, astrogliose e reatividade da microglia, após procedimento de axotomia ..... | 26 |
| 4.7.1. Análise quantitativa dos resultados.....   | 27 |
| 4.8. Regeneração Nervosa .....  | 28 |
| 4.8.1. Avaliação Morfométrica do Nervo Isquiático .....   | 30 |
| 4.9. Avaliação ultraestrutural da medula espinal .....  | 31 |
| 4.9.1. Análise da medula espinal nas secções ultra-finas .....  | 32 |
| 4.10. Avaliação motora .....  | 33 |
| 4.10.1. Avaliação motora da recuperação funcional .....   | 33 |
| 4.11. Avaliação sensitiva.....  | 34 |
| 4.11.1. Teste nociceptivo comportamental (von Frey eletrônico) .....  | 34 |
| 4.12. Análise estatística dos resultados .....  | 36 |
| 5. Resultados .....   | 36 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.1. Ensaio de viabilidade celular .....             | 36  |
| 5.2. Caracterização das CTMMO .....                  | 36  |
| 5.3. Sobrevivência Neuronal .....                    | 37  |
| 5.4. Imunoistoquímica .....                          | 44  |
| 5.4.1. Atividade Sináptica .....                     | 47  |
| 5.4.2. Reatividade Glial.....                        | 53  |
| 5.4.3. Reatividade Microglial.....                   | 60  |
| 5.5. Regeneração Nervosa .....                       | 67  |
| 5.5.1 - Área do nervo isquiático .....               | 67  |
| 5.5.2. Contagem de axônios mielinizados.....         | 75  |
| 5.6. Avaliação Morfométrica do Nervo Isquiático..... | 81  |
| 5.6.1. Diâmetro das Fibras Mielínicas (DF).....      | 84  |
| 5.6.2. Diâmetro dos Axônios Mielínicos (DAM) .....   | 84  |
| 5.6.3. Espessura da Bainha de Mielina (EBM).....     | 84  |
| 5.6.4. Razão “g” (RZG).....                          | 84  |
| 5.7. Análise ultraestrutural da medula espinal ..... | 88  |
| 5.8. Avaliação Motora .....                          | 94  |
| 5.9. Avaliação Sensitiva .....                       | 95  |
| 6. Discussão .....                                   | 96  |
| 7. Conclusões.....                                   | 105 |
| 8. Referências .....                                 | 107 |

## Resumo

A realização de reparos eficientes em lesões do sistema nervoso é um desafio para a medicina. O uso de modelos experimentais bem estabelecidos permite a avaliação de diferentes tratamentos a fim de prevenir as lesões causadas. O presente estudo investigou o potencial neuroprotetor e regenerativo de células tronco mononucleares da medula óssea (CTMMO), após reparo com selante de fibrina derivado da peçonha de serpente sobre neurônios motores e sensitivos, em ratos neonatos submetidos à axotomia do nervo isquiático. Para isso, os animais foram divididos em seis grupos: Grupo I (AX): axotomia do nervo isquiático sem tratamento; Grupo II (AX+SF): axotomia do nervo isquiático, seguida de reparo término terminal com selante de fibrina produzido pelo Centro de Estudos de Venenos de Animais Peçonhentos (CEVAP); Grupo III (AX+SF+CTMMO): axotomia do nervo isquiático, seguida de reparo término terminal com selante de fibrina do CEVAP e tratamento com CTMMO; Grupo IV (AX+CTMMO): axotomia do nervo isquiático, seguida de tratamento com CTMMO; Grupo V (AX+SFC): axotomia do nervo isquiático, seguida de reparo término terminal com selante de fibrina comercial; Grupo VI: Controle sem lesão (teste motor). Os animais foram analisados 4, 8 e 12 semanas após a lesão. Foram realizadas as técnicas de citometria de fluxo para caracterização das CTMMO; imunistoquímica para verificação da cobertura sináptica, gliose reativa e resposta microglial; coloração de Nissl para sobrevivência neuronal; morfometria do nervo isquiático, para verificar a regeneração nervosa; morfometria da medula espinal, para avaliar os inputs sinápticos, além dos testes motor (Catwalk) e sensitivo (von Frey), para avaliar a melhora funcional e nociceptiva. Testes ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni foram utilizados para análises estatísticas. O reparo com selante resultou em preservação da cobertura sináptica e aumento significativo da sobrevivência neuronal nos grupos em que o reparo foi realizado apenas com os selantes, ou quando foi associado com as CTMMO (aproximadamente 54%), comparativamente aos grupos em que não foi utilizado selante (aproximadamente 32%), em todos os períodos analisados. As reatividades astrogliar e microglial diminuíram nos mesmos grupos (AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC), 4 semanas após a lesão. Além disso, o reparo possibilitou a regeneração axonal, resultando em maior número de fibras nervosas, com diâmetro e espessura da bainha de mielina próximas ao controle e neurônios com preferência por terminais inibitórios no momento de recuperação. Conseqüentemente, os animais apresentaram recuperação funcional e sensitiva. Portanto, os resultados apresentados sugerem que o reparo do nervo isquiático com selante de fibrina em ratos neonatos resulta em neuroproteção e regeneração de neurônios motores e sensitivos, sendo que não foram detectados benefícios adicionais com a terapia celular empregada.

## Abstract

The efficient repair in nervous system related lesions is an ancient challenge for medicine. The use of well-established experimental models allows to evaluate the potential of different treatments in order to prevent the induced changes. The aim of this study was to evaluate the neuroprotective and regenerative potential of bone marrow mononuclear stem cells (BMMSC) after neurorrhaphy with fibrin sealant derived from snake venom on spinal motoneurons and DRG sensory neurons of neonatal rats subjected to sciatic nerve axotomy. Therefore, the animals were divided into six groups: Group I (AX): axotomy of the sciatic nerve without treatment; Group II (AX+FS): axotomy of the sciatic nerve, followed by end-to-end neurorrhaphy with fibrin sealant produced by CEVAP; Group III (AX+FS+BMMSC): axotomy of sciatic nerve, followed by treatment with BMMSC and end-to-end neurorrhaphy with fibrin sealant from CEVAP; Group IV (AX+BMMSC): sciatic nerve axotomy and treatment with BMMSC; Group V (AX+CFS): axotomy of the sciatic nerve, followed by end-to-end neurorrhaphy with commercial fibrin sealant; Group VI: Control group without lesion (motor tests). The samples were analyzed 4, 8 and 12 weeks post lesion. Flow cytometry was used to characterize the BMMSC. Immunohistochemistry to evaluate reactive gliosis, microglial reaction and synapse preservation. Nissl staining was employed to investigate neuronal survival; axonal regeneration by sciatic nerve morphometry; synaptic inputs, by spinal cord morphometry. Additionally, motor (walking track test) and sensitive (von Frey) behavior recovery was studied and correlated with morphological data. ANOVA and Bonferroni post-test was used for statistical analyses. Neurorrhaphy indicated preservation of synaptic covering on lesioned motoneurons and neuronal survival, in the groups repaired with both sealant alone or when treated with BMMSC (around 54%), as compared to axotomy alone (around 32%) in all analyzed survival times. Reactive gliosis and microglial reaction decreased in the same groups (AX+FS, AX+FS+BMMSC, AX+CFS) with 4 weeks. Regarding axonal regeneration, neurorrhaphy allowed recovery of greater number of myelinated fibers, that presented also improved morphometric parameters. In addition, preferential preservation of inhibitory synaptic terminals was detected in neurorrhaphy groups. Such results were accompanied by significant improvement in the motor as well as in the nociceptive recovery. Overall, the present data suggest that acute repair of neonatal peripheral nerves with fibrin sealant result in neuroprotection and regeneration of both motor and DRG neurons, not being further improved by BMMSC therapy.



## Lista de abreviaturas

BDNF: Brain derived neurotrophic factor (Fator neurotrófico derivado do cérebro)

BSA: Albumina de soro bovino

CTMMO: Células tronco mononucleares da medula óssea;

DAM: Diâmetro dos axônios mielínicos

DFM: Diâmetro das fibras mielínicas

DMEM: Meio de Eagle modificado pela Dubelco DNA – Ácido desoxirribonucleico

EBM: Espessura da bainha de mielina

EGFP: Proteína verde fluorescente potencializada

GDNF: Fator neurotrófico derivado da glia

GFAP: Proteína fibrilar ácida glial

IBA1: Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1

PBS: Tampão fosfato salina

RZG - Razão "g"

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

## Lista de figuras

**Figura 1.** Desenho esquemático das lâminas medulares (Rexed) de uma secção transversal da região da intumescência lombar de ratos. Em destaque está representada a região analisada (lâmina IX). Adaptado de Paxinos (2004), (88).

**Figura 2.** Representação do procedimento de axotomia e reparo. **A.** as setas indicam o nervo isquiático exposto; **B.** transecção do nervo isquiático no grupo I, as setas indicam os cotos proximal e distal separados; **C.** transecção do nervo isquiático seguida da junção dos cotos (reparo) com selante de fibrina nos grupos II (AX+SF), III (AX+SF+CTMMO) e V (AX+SFC). O círculo indica os cotos proximal e distal unidos.

**Figura 3.** Esquema de um motoneurônio alfa (lâmina IX) com terminais em aposição. As linhas tracejadas representam áreas onde foi medida a densidade integrada de pixels para o anticorpo anti-sinaptofisina. Figura retirada de Emirandetti et al. (2010), doi:10.1186/1742-2094-7-31 (94).

**Figura 4.** Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático. **A.** Cálculo da área total do nervo, observado na objetiva de 10X; **B.** contagem dos axônios, observados na objetiva de 100X.

**Figura 5.** Imagem do nervo isquiático em aumento de 1000X. **A.** Imagem, transformada em preto e branco. **B.** Mesma imagem, em que foi aplicado o limiar e apagado background e fibras que não apareciam inteiras na imagem original. Barra de escala: 10µm.

**Figura 6.** Eletromicrografia do microambiente sináptico mostrando os três tipos de terminais pré-sinápticos em aposição à membrana de um motoneurônio alfa medular. Terminais C, S e F, em destaque (Sabha et al, 2008).

**Figura 7.** Sistema Catwalk. **A.** Foto do equipamento, com a câmera de alta resolução em destaque. **B.** Plataforma onde os ratos caminham. **C** and **D.** Sistema em operação, com as patas destacadas. **E.** Dados adquiridos durante o teste. Fonte: <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/catwalk>.

**Figura 8.** Teste sensitivo (von Frey eletrônico). **A.** Caixas onde são colocados os ratos, arame não maleável abaixo das caixas e espelho. **B.** Pipeta de plástico acoplada ao transdutor de força que é aplicado sob a região plantar do animal.

**Figura 9.** Histograma da população de células-tronco mononucleares positivas para cada marcador de superfície. Análise por citometria de fluxo.

**Figura 10.** Cortes histológicos da região da medula lombar do núcleo motor lateral do corno ventral corados com a técnica de Nissl, 4 semanas após a axotomia do nervo isquiático. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 11.** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 4 semanas após a axotomia do nervo isquiático. AX- axotomia; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial (\*p <0.05).

**Figura 12.** Cortes histológicos da região da medula lombar do núcleo motor lateral do corno ventral corados com a técnica de Nissl, 8 semanas após a axotomia do nervo isquiático. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 13.** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 8 semanas após a axotomia do nervo isquiático. AX- axotomia; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial (\*p <0.05).

**Figura 14.** Cortes histológicos da região da medula lombar do núcleo motor lateral do corno ventral corados com a técnica de Nissl, 12 semanas após a axotomia do nervo isquiático. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 15.** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 12 semanas após a axotomia do nervo isquiático. AX- axotomia; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de

fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial (\*p <0.05).

**Figura 16.** Dupla marcação (NeuN / Sinaptofisina) associada à citoquímica com DAPI, em secções provenientes do grupo Axotomia (imagens ilustrativas) onde, núcleos celulares são visualizados em azul (DAPI), neurônios em verde (NeuN) e sinaptofisina em vermelho. **A-D.** imagens ampliadas da região da lâmina IX onde estão localizados os grupos de motoneurônios medulares do lado contralateral à lesão. **E-H.** imagens do grupo de motoneurônios medulares do lado ipsilateral à lesão. Barra de escala = 50µm.

**Figura 17.** Dupla marcação (NeuN / GFAP) associada à citoquímica com DAPI, em secções provenientes do grupo Axotomia (imagens ilustrativas) onde, núcleos celulares são visualizados em azul (DAPI), neurônios em verde (NeuN) e GFAP em vermelho. **A-D.** imagens ampliadas da região da lâmina IX onde estão localizados os grupos de motoneurônios medulares do lado contralateral à lesão. **E-H.** imagens do grupo de motoneurônios medulares do lado ipsilateral à lesão. Barra de escala = 50µm.

**Figura 18.** Dupla marcação (NeuN / Iba-1) associada à citoquímica com DAPI, em secções provenientes do grupo Axotomia (imagens ilustrativas) onde, núcleos celulares são visualizados em azul (DAPI), neurônios em vermelho (NeuN) e Iba-1 em verde. **A-D.** imagens ampliadas da região da lâmina IX onde estão localizados os grupos de motoneurônios medulares do lado contralateral à lesão. **E-H.** imagens do grupo de motoneurônios medulares do lado ipsilateral à lesão. Barra de escala = 50µm.

**Figura 19.** Dupla marcação (Iba-1 / GFAP), em secções provenientes do grupo Axotomia (imagens ilustrativas) onde, Iba-1 é visualizado em verde e GFAP em vermelho. **A-C.** imagens ampliadas da região da lâmina IX onde estão localizados os grupos de motoneurônios medulares do lado contralateral à lesão. **D-F.** imagens do grupo de motoneurônios medulares do lado ipsilateral à lesão. Barra de escala = 50µm.

**Figura 20.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinaptofisina, 4 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 21.** Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica, 4 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05).

**Figura 22.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinaptofisina, 8 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina. **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 23.** Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica, 8 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de

fibrina comercial; (\*p <0.05).

**Figura 24.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinaptofisina, 12 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 25.** Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica 12 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05).

**Figura 26.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-GFAP, 4 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 27.** Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa, 4 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05).

**Figura 28.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-GFAP, 8 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 29.** Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa, 8 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05).

**Figura 30.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-GFAP, 12 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 31.** Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa 12 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05).

**Figura 32.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-Iba1,

4 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm

**Figura 33.** Representação gráfica da quantificação da reatividade microglial, 4 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05).

**Figura 34.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-Iba1, 8 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 35.** Representação gráfica da quantificação da reatividade microglial, 8 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05).

**Figura 36.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-Iba1, 12 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

**Figura 37.** Representação gráfica da quantificação da reatividade microglial, 12 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05).

**Figura 38.** Análise da área dos nervos, 4 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 100µm.

**Figura 39.** Representação gráfica da área do nervo isquiático, 4 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Contralateral – nervo não lesionado (\*p <0.05).

**Figura 40.** Análise da área do nervo isquiático, 8 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina

comercial; **F.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 100µm.

**Figura 41.** Representação gráfica da área do nervo isquiático, 8 semanas após a lesão. **AX-** axotomia; **AX+CTMMO-** axotomia seguida de tratamento com células tronco; **AX+SF-** axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **AX+SF+CTMMO-** axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **AX+SFC-** axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **Contralateral** – nervo não lesionado (\*p <0.05).

**Figura 42.** Análise da área do nervo isquiático, 12 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 100µm.

**Figura 43.** Representação gráfica da área do nervo isquiático, 12 semanas após a lesão. **AX-** axotomia; **AX+CTMMO-** axotomia seguida de tratamento com células tronco; **AX+SF-** axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **AX+SF+CTMMO-** axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **AX+SFC-** axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **Contralateral** – nervo não lesionado (\*p <0.05).

**Figura 44.** Representação gráfica da área do nervo isquiático 4, 8 e 12 semanas após a axotomia do nervo isquiático. **AX+SF-** axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **AX+SF+CTMMO-** axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **AX+SFC-** axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **Contralateral-** Controle sem lesão(\*p <0.05).

**Figura 45.** Análise da contagem de axônios mielinizados, 4 semanas após a lesão. **A.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **B.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **C.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **D.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 10µm.

**Figura 46.** Representação gráfica da contagem dos axônios, 4 semanas após a lesão. **AX-** axotomia; **AX+CTMMO-** axotomia seguida de tratamento com células tronco; **AX+SF-** axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **AX+SF+CTMMO-** axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **AX+SFC-** axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **Contralateral** – nervo não lesionado (\*p <0.05).

**Figura 47.** Análise da contagem de axônios mielinizados, 8 semanas após a lesão. **A.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **B.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **C.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **D.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 10µm.

**Figura 48.** Representação gráfica da contagem dos axônios, 8 semanas após a lesão. **AX-** axotomia; **AX+CTMMO-** axotomia seguida de tratamento com células tronco; **AX+SF-** axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **AX+SF+CTMMO-** axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **AX+SFC-** axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **Contralateral** – nervo não lesionado (\*p <0.05).

**Figura 49.** Análise da contagem de axônios mielinizados, 12 semanas após a lesão. **A.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **B.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **C.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **D.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 10µm.

**Figura 50.** Representação gráfica da contagem dos axônios, 12 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Contralateral – nervo não lesionado (\*p <0.05).

**Figura 51.** Representação gráfica do diâmetro da fibra, 4 semanas após a lesão. **(A-G)** dados estatisticamente significantes entre os grupos nos diâmetros entre 1 a 8 µm. Contra- nervo não lesionado; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).

**Figura 52.** Representação gráfica do diâmetro do axônio, 4 semanas após a lesão. **(A-F)** dados estatisticamente significantes entre os grupos nos diâmetros entre 1 a 6 µm. Contra- nervo não lesionado; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).

**Figura 53.** Representação gráfica da espessura da bainha de mielina, 4 semanas após a lesão. **(A-F)** dados estatisticamente significantes entre os grupos nas espessuras de 0,2 a 1,4 µm. Contra- nervo não lesionado; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).

**Figura 54.** Distribuição de frequência do diâmetro das fibras nervosas em todos os grupos analisados 4, 8 e 12 semanas pós lesão. **(A, B, C)** Lado ipsilateral, 4 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(D)** Lado contralateral, 4 semanas após a lesão. **(E)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro das fibras, 4 semanas após a lesão. **(F, G, H)** Lado ipsilateral, 8 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(I)** Lado contralateral, 8 semanas após a lesão. **(J)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro das fibras, 8 semanas após a lesão. **(K, L, M)** Lado ipsilateral, 12 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(N)** Lado contralateral, 12 semanas após a lesão. **(O)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro das fibras, 12 semanas após a lesão.

**Figura 55.** Distribuição de frequência do diâmetro dos axônios em todos os grupos analisados 4, 8 e 12 semanas pós lesão. **(A, B, C)** Lado ipsilateral, 4 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(D)** Lado contralateral, 4 semanas após a lesão. **(E)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro dos axônios, 4 semanas após a lesão. **(F, G, H)** Lado ipsilateral, 8 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(I)** Lado contralateral, 8 semanas após a lesão. **(J)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro dos axônios, 8 semanas após a lesão. **(K, L, M)** Lado ipsilateral, 12 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(N)** Lado contralateral, 12 semanas após a lesão. **(O)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro dos axônios, 12 semanas após a lesão.

**Figura 56.** Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina em todos os grupos analisados 4, 8 e 12 semanas pós lesão. **(A, B, C)** Lado ipsilateral, 4 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(D)** Lado contralateral, 4 semanas após a lesão. **(E)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da espessura da bainha de mielina, 4 semanas após a lesão. **(F, G, H)** Lado ipsilateral, 8 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(I)** Lado contralateral, 8 semanas após a lesão. **(J)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da espessura da bainha de mielina,

8 semanas após a lesão. **(K, L, M)** Lado ipsilateral, 12 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(N)** Lado contralateral, 12 semanas após a lesão. **(O)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da espessura da bainha de mielina, 12 semanas após a lesão.

**Figura 57.** Distribuição de frequência da razão “g” e *dotplot* entre a razão “g”/diâmetro do axônio, em todos os grupos analisados 4, 8 e 12 semanas pós lesão. **(A, B, C)** Lado ipsilateral, 4 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(D)** Lado contralateral, 4 semanas após a lesão. **(E)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da razão “g”, 4 semanas após a lesão. **(F, G, H)** Lado ipsilateral, 8 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(I)** Lado contralateral, 8 semanas após a lesão. **(J)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da razão “g”, 8 semanas após a lesão. **(K, L, M)** Lado ipsilateral, 12 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(N)** Lado contralateral, 12 semanas após a lesão. **(O)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da razão “g”, 12 semanas após a lesão.

**Figura 58.** Ultraestrutura da superfície de motoneurônios alfa medulares na região dorso lateral da medula, mostrando a cobertura sináptica. **A.** Lado contralateral; **B.** Cobertura sináptica com terminais retraídos e projeções astrocitárias (\*) no grupo axotomia (AX); **C.** Grupo em que foi realizado o reparo com selante de fibrina derivado do veneno de serpente (AX+SF); **D.** Grupo onde foi realizado o reparo com selante de fibrina comercial (AX+SFC). Escala: 500 nm.

**Figura 59.** Representação gráfica da análise quantitativa ultraestrutural dos tipos de terminais F, S e C, 4 semanas após axotomia e reparo. Porcentagem de cobertura sináptica total (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). Média ± erro padrão; n=3.

**Figura 60.** Representação gráfica da análise quantitativa ultraestrutural dos tipos de terminais F, S e C, 4 semanas após axotomia e reparo. Número de terminais sinápticos F, S e C em aposição/100 µm (\*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001); Média ± erro padrão; n=3.

**Figura 61.** Representação gráfica da análise quantitativa ultraestrutural dos tipos de terminais F, S e C, 4 semanas após axotomia e reparo. Tamanho dos terminais; Média ± erro padrão; n=3.

**Figura 62.** Distribuição dos intervalos entre terminais sinápticos ao longo da membrana do corpo dos motoneurônios, 4 semanas após axotomia. **A.** distribuição normal dos intervalos entre os terminais pré-sinápticos. **B.** alteração da distribuição dos terminais pré-sinápticos devido à retração. **C e D.** restauração dos intervalos ao longo da membrana dos motoneurônios.

**Figura 63.** Análise da função motora dos animais com oito semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina derivado da peçonha de serpente; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Controle, sem lesão (\*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).

**Figura 64.** Gráfico das médias por grupo das medidas no teste de nocicepção sensitiva. **A.** grupo axotomia (AX); **B.** grupo axotomia, seguida de tratamento com CTMMO; **C.** grupo axotomia, seguido de reparo com selante de fibrina (AX+SF); **D.** grupo axotomia, seguido de reparo com selante de fibrina e tratamento com CTMMO (AX+SF+CTMMO); **E.** grupo axotomia, seguido de reparo com selante de fibrina comercial (AX+SFC). Os gráficos expressam o valor bruto em gramas da força aplicada para gerar o arco-reflexo, força g, (p<0.001).



## Lista de tabelas

**Tabela 1.** Lista de anticorpos primários utilizados para as duplas marcações de imunistoquímica.

**Tabela 2.** Lista de anticorpos secundários utilizados para as duplas marcações imunistoquímica.

**Tabela 3.** Razão percentual entre o número de motoneurônios presentes no lado ipsi e contralateral em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão;  $p \leq 0,0001$ .

**Tabela 4.** Razão percentual da densidade integrada de pixels do anticorpo anti-Sinaptofisina entre os lados ipsi e contralateral em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão;  $p \leq 0,0001$ .

**Tabela 5.** Razão percentual da densidade integrada de pixels, do anticorpo anti-GFAP, entre os lados ipsi e contralateral em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão;  $p \leq 0,0001$ .

**Tabela 6.** Razão percentual da densidade integrada de pixels, do anticorpo anti-Iba1, entre os lados ipsi e contralateral em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão;  $p \leq 0,0001$ .

**Tabela 7.** Média da área dos nervos em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão;  $p \leq 0,0001$ .

**Tabela 8.** Média do número de axônios regenerados em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão;  $p \leq 0,0001$ .

## 1. Introdução

O sistema nervoso consiste de uma porção central (Sistema Nervoso Central – SNC) e uma periférica (Sistema Nervoso Periférico – SNP). Suas funções envolvem o processamento de informações sensoriais, controle motor, mediação de respostas autonômicas, elaboração de respostas emocionais, aprendizagem e memória. O SNC contém uma ampla variedade de neurônios com diferentes morfologias e funções, entre eles os neurônios sensitivos e os motoneurônios, que têm função de conduzir impulsos aferentes e eferentes, respectivamente. O SNP é constituído pelos nervos e gânglios, cuja função é conectar o SNC às diversas partes do corpo (1).

Durante a embriogênese do sistema nervoso, neurônios são gerados em excesso e, através de um processo de ajuste finamente regulado, grande parte destes é eliminada (2, 3). Por sua vez, outros neurônios estabelecerão contatos sinápticos entre si e/ou com órgãos alvo, sobrevivendo assim pelo adequado suprimento de fatores neurotróficos, que são fundamentais para a diferenciação e sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento, contribuindo para manutenção das funções dos neurônios adultos (3-6). Esses fatores influenciam na atividade neural, incluindo a atividade sináptica, promovendo o desenvolvimento durante o período embrionário, bem como a manutenção e sustentação durante a vida adulta e a sobrevivência dos neurônios após uma lesão nervosa (7, 8).

O sistema nervoso é muito sensível a lesões e sua capacidade regenerativa é um processo complexo e limitado (9). O microambiente da medula após uma lesão desfavorece a regeneração axonal, pois há secreção de moléculas inibitórias por astrócitos e oligodendrócitos. Além disso, há interrupção no fornecimento de fatores neurotróficos (10) e formação de cicatriz glial, que age física e quimicamente, podendo levar à morte neuronal. A carência de fatores neurotróficos apropriados em um padrão temporal afeta a sobrevivência e inibe a reconexão das sinapses dos neurônios lesionados (11, 12).

A perda da homeostase no sistema nervoso central está relacionada com a ativação de células gliais, dentre elas os astrócitos, os quais ficam mais reativos após a injúria (13). A microglia também se torna ativada nas lesões e tem papel de fagocitose e síntese de moléculas pró-inflamatórias (14).

Neste sentido, a regeneração do SNP é dependente de uma série de eventos necessários para reajustar o microambiente do nervo lesado, com objetivo de reestabelecimento da homeostasia (9).

Lesões periféricas podem ocorrer devido a traumas derivados da prática de esportes intensos, acidentes automobilísticos e outros, ocasionando trauma em nervos periféricos. Podem ocorrer também em partos complicados, nos quais os nervos podem ser desconectados por tração, levando à lesão do plexo braquial. A incidência desse trauma está entre 0,42 -2,9 casos/1.000 nascimentos e, em sua maioria, é irreversível (15). Nesses acidentes, geralmente um nervo misto é afetado, portanto o nervo isquiático é um modelo adequado para avaliar a complexidade da reinervação, permitindo a avaliação da recuperação motora e sensitiva (16).

Em lesões dos nervos periféricos ocorrem alterações funcionais tanto sensitivas quanto motoras. Procedimentos experimentais de axotomia podem ser empregados em estudos para avaliar a morte ou sobrevivência neuronal, visando o processo regenerativo (17). Este procedimento consiste na transecção ou compressão de axônios, que compõem um determinado nervo com variável preservação do tecido conectivo (18).

A axotomia de um nervo periférico causa uma resposta tissular complexa no SNC, prejudicando tanto o corpo celular dos neurônios afetados quanto o microambiente circunjacente e se manifesta através de diversas alterações morfológicas (9), como cromatólise (19); e funcionais como o aumento da expressão de fatores neurotróficos (p75<sup>NGFR</sup>, tirosinacinasas, GRFa-1, BDNF e GDNF) (20-25); e retração de terminais sinápticos em contato com o corpo do neurônio axotomizado (26-28).

De maneira mais específica, após lesão nervosa periférica, inicia-se um processo denominado degeneração Walleriana, distalmente ao sítio da lesão, que tem como evento chave a degeneração dos fragmentos distais dos axônios lesados, assim como a fragmentação da bainha de mielina, que requer contato com o axônio para manutenção. As células de Schwann se desconectam da bainha de mielina, proliferam, produzem citocinas e fatores tróficos e participam da fagocitose dos restos de mielina e de axônios degenerados (29,30). Uma vez presentes no microambiente da lesão, os macrófagos fagocitam os restos de mielina e produzem fatores que facilitam a migração das células de Schwann. Por outro lado, na porção proximal à lesão, o corpo celular apresenta um conjunto de

alterações, como inchaço do corpo celular, mudança do núcleo para a periferia e fragmentação do retículo endoplasmático rugoso (corpúsculo de Nissl). Ocorrem também alterações metabólicas, como síntese de proteínas e de RNA e alterações no padrão gênico expresso pelos neurônios. Há prioridade na síntese de proteínas quando um neurônio é lesionado, relacionadas ao reparo dos axônios. Essas alterações podem ser reversíveis, caso a regeneração for bem-sucedida (31).

Neurônios motores e sensitivos em ratos neonatos, particularmente durante a primeira semana pós-natal, são vulneráveis à lesão axonal, devido à sua imaturidade morfológica e funcional (32). Experimentos mostraram que a transecção do nervo isquiático de ratos no dia do nascimento (P0), leva à morte de 53% a 89% dos neurônios sensitivos axotomizados, além de provocar a perda de praticamente todos os motoneurônios atingidos (29, 34). De acordo com Lowrie e Vbrová (1992), a morte neuronal se inicia no terceiro dia após a axotomia, atingindo seu ápice em uma semana (35). Kashihara et al. (1987), observaram uma significativa redução do suprimento de fatores neurotróficos após a lesão axonal, resultando na morte celular da maioria das células lesionadas (36).

Após a transecção do nervo periférico, surge a necessidade de se reaproximar os cotos separados pela fenda após a sua retração. Vários procedimentos, como a sutura das bainhas conjuntivas (neurorrafia), implantes de autoenxertos de músculo estriado esquelético e nervos periféricos, além da tubulização, são propostos para tal finalidade (37, 38).

Os selantes de fibrina comerciais vêm sendo utilizados em neurocirurgia, mostrando-se eficientes por não induzir danos ao sistema nervoso (39, 40). Esses biomateriais são formados por dois componentes principais: fibrinogênio e trombina que, uma vez misturados, originam matriz de fibrina bioativa com propriedades hemostáticas e adesivas, mimetizando a via final da cascata de coagulação (41). Nesses produtos, o fibrinogênio é clivado e convertido em polímeros de fibrina pela ação da trombina.

Alguns selantes comerciais são complementados com o fator XIII, o que pode aumentar a resistência à tração, a estabilidade do coágulo e melhorar a hemostasia (42-44). Este componente desempenha um papel bem estabelecido na coagulação natural e estabilização do coágulo, sendo a enzima final ativada na cascata de coagulação do sangue, facilitando assim, a formação de ligações cruzadas covalentes dentro da rede de fibrina. Forma-se então uma malha, após a ativação

pela trombina, melhorando seu desempenho para o uso clínico (44).

Resultados promissores foram evidenciados no remodelamento ósseo e cartilágneo, quando estes selantes foram associados à condrócitos (45, 46), fragmentos ósseos (47) e células tronco (48, 49). Entretanto, os selantes de fibrina convencionais são compostos de fibrinogênio extraído de plasma humano na forma de crioprecipitado, trombina bovina, cloreto de cálcio e aprotinina. Deste modo, apesar de testes rigorosos serem realizados antes do preparo, podem trazer riscos à saúde humana pela transmissão de doenças infecto-contagiosas como a hepatite e AIDS. Além disso, relatos de necrose e formação de seromas foram observados após uso de selantes comerciais (50).

O Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da UNESP/Botucatu, desenvolveram um selante, cuja composição utiliza soro de bubalinos como fonte de fibrinogênio e uma serinoprotease (trombina-símile), derivado da peçonha de serpente do gênero *Crotalus*, como fonte de substituição da trombina humana (51). Esta proteína possui atividade semelhante à trombina humana ou animal, por ser capaz de converter o fibrinogênio diretamente em fibrina (52-55). Portanto, esse novo selante não utiliza sangue humano em sua composição, evitando assim o risco de transmissão de doenças infecciosas, além de ser um forte candidato para “*drug delivery*” (56-58). Atualmente o produto foi patenteado e está sendo utilizado em vários campos de pesquisa, inclusive no tratamento de úlceras venosas em humanos (59).

Resultados similares foram observados comparando o selante do CEVAP e o comercialmente disponível, após lesão do nervo isquiático de ratos, mostrando que o novo selante também promove aderência e reparação adequadas (60).

Além disso, foi observado em outros estudos, a regeneração do nervo isquiático, quando utilizado o selante de fibrina do CEVAP, utilizando a terapia com laser ou não (61), no suporte para o tratamento de defeitos no crânio (62) e na imobilização de enxertos periodontais (63, 64). Este selante também foi utilizado no reimplante de raízes nervosas dorsais e ventrais, agindo como um substrato para o crescimento axonal e auxiliando na manutenção da homeostase no microambiente adjacente à lesão. (65-67). Cartarozzi et al. (2015) também observaram regeneração nervosa após axotomia do nervo isquiático, em animais adultos, sendo o reparo baseado na utilização da técnica de tubulização e adição de selante de fibrina do CEVAP (68).

A viabilidade de obtenção de formulações com diferentes características também confere abertura a possíveis associações deste novo selante com diferentes células potencialmente benéficas para o processo regenerativo do sistema nervoso, como por exemplo, as células tronco. Já foi observado que o selante de fibrina derivado do veneno de serpentes possa ser utilizado como arcabouço (*scaffold*) para adição de tratamentos, como o uso de células tronco, por exemplo (69). Foi visto que o uso dessas células, em associação ao selante, pode potencializar tais efeitos, gerando microambiente mais permissivo à regeneração nervosa (65-67).

Pesquisas com células tronco mesenquimais mostraram sua viabilidade no tratamento de doenças e lesões do SNC (70-72). Sabe-se que o benefício neurológico resultante do tratamento com células tronco mesenquimais humanas em ratos sugere aumento de fatores neurotróficos no tecido nervoso isquêmico. O efeito neuroprotetor promovido por essas células pode estar associado à produção de fatores neurotróficos locais, capazes de ampliar e promover a regeneração de fibras nervosas no sítio da lesão (73, 74), bem como influenciar positivamente sobre na sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica (72).

Em contrapartida, estudos com células tronco mononucleares da medula óssea (CTMMO) apontaram resultados promissores para o tratamento da cardiomiopatia dilatada (75), infarto do miocárdio (76, 77), isquemia sistêmica aguda (78, 79) insuficiência renal (80), recuperação da função motora e regeneração nervosa (81, 82), assim como em lesões da medula espinal (83, 84).

Algumas vantagens que as CTMMO apresentam sobre outras linhagens de células tronco são: procedimento para obtenção minimamente invasivo na prática médica, menor tempo e custo de processamento, dispensa a utilização de imunossupressores, baixo potencial oncogênico e não esbarram em problemas éticos. Além disso, as CTMMO expressam fatores tróficos, auxiliando a regeneração nervosa e podem facilmente ser aplicadas com auxílio de biomateriais, por meio de arcabouços (85, 86). Portanto, os selantes de fibrina aparecem como uma excelente alternativa, pois promovem uma rápida resolução e estabilização dessas células no local evitando seu deslocamento inicial.

Diante desse contexto, o melhor conhecimento do potencial neuroprotetor das células tronco associado ao reparo com selante de fibrina pode representar uma estratégia adicional para o tratamento de lesões neurodegenerativas, incluindo aquelas ocorridas no período neonatal, quando

os neurônios motores e sensitivos medulares se mostram sensíveis à falta de contato com o órgão alvo.

## **2. Justificativa**

A realização de reparos eficientes em lesões do sistema nervoso é um desafio para a medicina. Compreender o rearranjo dos circuitos neurais, provocado por essas lesões, pode ser um passo fundamental para otimizar a sobrevivência e a capacidade regenerativa dos neurônios motores e sensitivos. A utilização de modelos experimentais bem estabelecidos permite avaliar o potencial de diferentes tratamentos, a fim de prevenir as alterações induzidas por tais lesões. Diante desse desafio, o sistema nervoso de neonatos apresenta maior sensibilidade às lesões periféricas, que leva à degeneração retrógrada de neurônios sensitivos e motores. Neste sentido, a axotomia do nervo periférico, em ratos neonatos, é um modelo consagrado para o estudo de agentes ou técnicas que possam levar à neuroproteção.

Adicionalmente, a aplicação experimental e clínica de selantes de fibrina vêm despertando grande interesse na área médico-científica devido à possibilidade da realização de procedimentos cirúrgicos sem a necessidade de suturas convencionais, podendo ser empregado em cirurgias internas e externas. Em neurocirurgia, esses selantes são empregados há mais de 20 anos, mostrando-se eficazes para procedimentos de reparo, pois não induzem danos ao sistema nervoso.

A possibilidade da utilização de um novo selante de fibrina, diferenciado e derivado da peçonha de serpente pode ser uma alternativa, pois permite formulação personalizada à necessidade de cada cirurgia. Além disso, esse selante não utiliza sangue humano em sua composição, o que impede a transmissão de agentes infecciosos como o HIV, doenças como a hepatite, entre outras e o custo de produção em larga escala tende a ser mais baixo, já que a tecnologia utilizada na fabricação é totalmente nacional.

A viabilidade de obtenção de formulações com variadas características é outra vantagem apresentada por este selante, que poderá conferir associações com as células tronco mononucleares da medula óssea (CTMMO), atuando como arcabouço no transplante, não somente pela

biocompatibilidade e degradação, mas pela própria capacidade de ligação conferida pelas suas características adesivas, podendo atuar como substrato e arcabouço (*scaffold*).

Assim, as CTMMO, que são células que expressam fatores tróficos e auxiliam no processo da regeneração nervosa, poderiam permanecer em contato com o nervo em regeneração por um período mais prolongado. Uma melhor investigação sobre a compreensão do potencial neuroprotetor das CTMMO, associado ao reparo com o selante de fibrina, poderá representar uma estratégia adicional para o tratamento de lesões neurodegenerativas, incluindo aquelas ocorridas no período neonatal, quando os neurônios motores e sensitivos medulares se mostram sensíveis à falta de contato com o órgão alvo.

Portanto, a intenção dessa pesquisa foi avaliar o selante de fibrina derivado da peçonha de serpente no reparo de nervos axotomizados, assim como a adição de células que poderiam ser benéficas para a regeneração nervosa, com a possibilidade de solucionar a carência de tratamento eficazes no que diz respeito à essas lesões.

### **3. Objetivos**

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

Avaliar o potencial neuroprotetor e regenerativo das células tronco mononucleares de medula óssea (CTMMO), após reparo com selante de fibrina derivado da peçonha de serpente sobre neurônios motores medulares e sensitivos em ratos neonatos submetidos à axotomia do nervo isquiático.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a sobrevivência neuronal em animais submetidos à axotomia do nervo isquiático, após reparo com selante de fibrina;
- Detectar a presença de gliose reativa nos segmentos medulares correspondentes à lesão (L4, L5 e L6), por imunistoquímica;
- Avaliar a expressão de sinaptofisina no microambiente dos motoneurônios medulares após o reparo com selante de fibrina, por imunistoquímica;



- Avaliar a regeneração do nervo isquiático por meio de contagem de axônios sobreviventes, área total do nervo e análise morfométrica (diâmetro das fibras, diâmetro dos axônios, espessura da bainha de mielina e razão “g”) por microscopia de luz;
- Analisar a disposição e comportamento dos *inputs* dos motoneurônios alfa medulares na intumescência lombar (% da cobertura sináptica para cada tipo de terminal sináptico (F, S e C), número de terminais e medir o intervalo entre eles), através da microscopia eletrônica de transmissão, em ratos submetidos à axotomia e reparo com selante, associadas ou não às CTMMO;
- Verificar a recuperação da marcha nos animais após reparo com o selante de fibrina, por meio do sistema CatWalk (walking track test);
- Avaliar a melhora nociceptiva dos animais axotomizados e submetidos ao reparo com selante de fibrina com ou sem terapia com as CTMMO, através do teste de von Frey;
- Comparar a eficiência do reparo realizado com selante de fibrina derivado da peçonha de serpente com selante de fibrina comercial.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal**

Esta pesquisa foi submetida à Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP), sendo aprovada sob protocolos 904-2011 e 2593-1, respectivamente.

#### **4.1.2. Animais**

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos neonatos da linhagem Lewis, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Regeneração Nervosa do Departamento de Anatomia (Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP), com temperatura controlada (23°C) e ciclo de claro/escuro de 12h.

### 4.1.3. Delineamento experimental

Foram utilizados 160 ratos neonatos, com dois dias de vida (85 para análise imunoistoquímica, sobrevivência neuronal e teste motor; 75 para análise de limiar nociceptivo, morfometria do nervo isquiático e da medula espinal). Para tanto, os animais foram distribuídos em seis grupos (n=5/ Grupo), conforme descrição abaixo:

Grupo I (AX): axotomia do nervo isquiático sem tratamento;

Grupo II (AX+SF): axotomia do nervo isquiático + reparo término terminal com selante de fibrina;

Grupo III (AX+SF+CTMMO): axotomia do nervo isquiático, seguida de reparo término terminal com selante de fibrina e tratamento com CTMMO;

Grupo IV (AX+CTMMO): axotomia do nervo isquiático, seguida de tratamento com CTMMO;

Grupo V (AX+SFC): axotomia do nervo isquiático + reparo término terminal com selante de fibrina comercial;

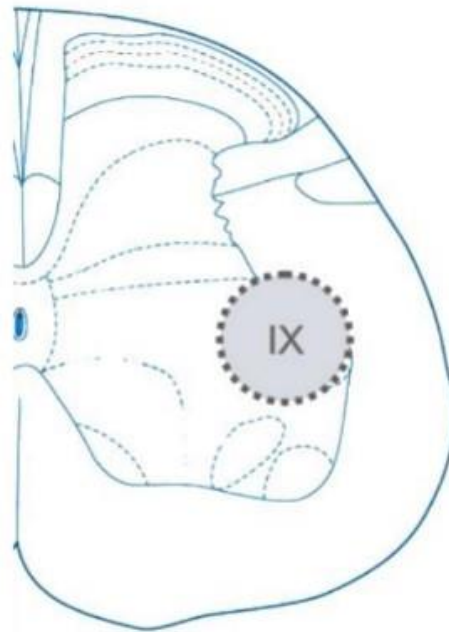
Grupo VI: controle sem lesão, em que não foi realizada a axotomia (grupo analisado apenas para teste motor).

Após o procedimento de axotomia, os animais foram avaliados no período de 4, 8 e 12 semanas. A partir da segunda semana pós-natal, os animais foram avaliados duas vezes por semana no sistema CatWalk, para avaliação motora. Para avaliação sensitiva, os animais foram analisados a partir da quarta semana de vida, momento em que é feito o desmame.

Para as técnicas de imunoistoquímica, sobrevivência neuronal e análise morfométrica, as medulas foram analisadas. Levando-se em consideração a organização dos neurônios na substância cinzenta medular, feita por Rexed em 1952, as análises foram feitas na região da lâmina IX, que contém os núcleos motores que estão conectados à região L4, L5 e L6 na medula espinal, responsáveis pela inervação dos membros inferiores (87) (Figura 1). O lado não axotomizado de cada animal foi utilizado como controle interno para análise dos resultados.

Para a técnica de morfometria foram dissecados os nervos isquiáticos tanto ipsi como

contralateral.



**Figura 1.** Desenho esquemático das lâminas medulares (Rexed) de uma secção transversal da região da intumescência lombar de ratos. Em destaque está representada a região analisada (lâmina IX). Adaptado de Paxinos (2004), (88).

## **4.2. Obtenção do selante de fibrina**

### **4.2.1. Obtenção do selante de fibrina derivado da peçonha de serpente**

O selante de fibrina derivado de veneno de serpente foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP), cujos componentes e fórmula de aplicação constam em suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). No momento do uso os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados de acordo com o protocolo do presente projeto (50, 69, 89-91).

#### **4.2.2. Obtenção do selante de fibrina comercial**

O selante comercial utilizado foi o Tissucol (Baxter®), produzido em Viena, Áustria.

#### **4.3. Obtenção das células tronco mononucleares (CTMMO)**

##### **4.3.1. Extração das células tronco derivadas da medula óssea**

Para o cultivo das células mononucleares da medula óssea foram utilizados ratos Lewis com quatro a seis semanas de idade. Os animais foram eutanasiados com dose letal de halotano (Tanohalo, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos). O fêmur e a tíbia foram utilizados para a extração.

Em fluxo laminar, uma das epífises dos ossos foi cortada, expondo-se a medula óssea, que foi coletada através da centrifugação a 1500 rpm por 2 minutos, diluída em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco (DMEM).

##### **4.3.2. Isolamento das células mononucleares**

Após o processo de centrifugação, as hemácias e leucócitos atravessam a fase orgânica (Ficoll-Hystopaque) e sedimentam. As plaquetas e proteínas plasmáticas localizam-se na fase aquosa, enquanto que as CTMMO ficam na interface entre a fase orgânica e a aquosa. O anel de células mononucleares foi cuidadosamente coletado e transferido para um frasco contendo meio PBS. As células então foram lavadas 2x a 1500 rpm por 10 minutos e ressuspensas em PBS e a contagem foi realizada na câmara de Neubauer. A concentração celular na suspensão (número de células por mL) foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Concentração celular} = n \times \text{fator de diluição} \times \text{volume original da suspensão} \times 10^4$$

Onde  $n$  é a média do número de células obtidas em todos os quadrantes da câmara de *Neubauer* e  $10^4$  é o valor padrão de referência da mesma.

##### **4.3.3. Ensaio de viabilidade celular**

Uma amostra das células ressuspensas em PBS foi submetida à coloração vital de *Azul*

de *Tripán* (Reagentes Analíticos Dinâmica, Brasil) para a estimativa da viabilidade celular. Foi utilizada a câmara de *Neubauer* para a contagem celular, que foi realizada até 48h após a extração (74) em duas alíquotas que foram armazenadas sob diferentes condições: na incubadora (a 37°C) e sob refrigeração (a - 4 °C).

#### **4.4 Caracterização das células tronco mononucleares**

##### **4.4.1. Análise fenotípica das CTMMO por citometria de fluxo**

A análise das moléculas de superfície das CTMMO foi realizada por meio da técnica de citometria de fluxo para caracterização da população celular através da presença das seguintes moléculas de superfície celular:

- 1. camundongo anti-rato CD3** (BD Pharmingen) conjugado com PE, marcador de linfócitos T (TCR);
- 2. camundongo anti-rato CD11b** (BD Pharmingen) conjugado com FITC, marcador de macrófagos e neutrófilos;
- 3. camundongo anti-rato CD34** (R&D Systems), marcador de células tronco hematopoiéticas;
- 4. camundongo anti-rato CD45** (BD Pharmingen) conjugado com FITC, marcador de células hematopoiéticas progenitoras - receptor de proteína tirosina fosfatase;
- 5. camundongo anti-rato CD90** (BD Pharmingen) conjugado com PE, marcador de células tronco hematopoiéticas, células jovens mielóides e eritrócitos e linfócitos B imaturos.

Para a citometria de fluxo, aproximadamente  $1 \times 10^7$  células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com os anticorpos conjugados descritos acima. As células foram lavadas com PBS e, nos casos onde não foram usados anticorpos primários conjugados, incubadas com anticorpo secundário (R&D Systems) por 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em PBS, fixadas em paraformaldeído 1% e analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Como controle negativo de fluorescência, também se adicionou o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho *versus* granulosidade para estabelecer a população a ser analisada.

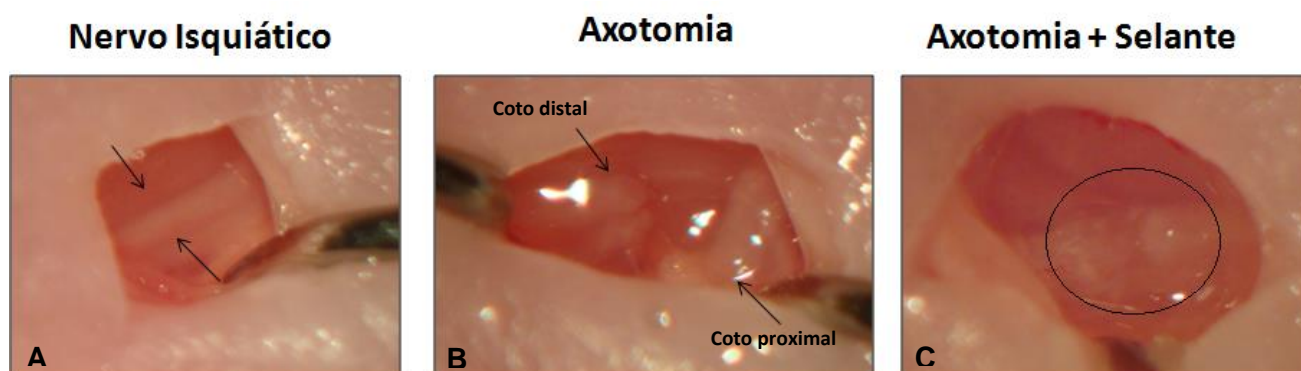
Aproximadamente 100.000 eventos foram adquiridos, utilizando-se o software de aquisição CELLQuest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os dados obtidos foram analisados pelo software de análise BD FACSDiva.

#### **4.5. Procedimento cirúrgico para transecção do nervo isquiático**

Os ratos foram anestesiados por hipotermia (92). Após a incisão da pele na região média da coxa, a musculatura glútea foi cuidadosamente afastada, expondo-se o nervo isquiático para realização da lesão, sob o microscópio cirúrgico (Figura 2A). A neurotmesa (transecção completa) do nervo isquiático foi realizada com uma microtesoura, sendo um segmento do terço médio de 2mm removido, no grupo axotomia (Figura 2B). Nos grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, os cotos distal e proximal foram reposicionados após a lesão e os componentes do selante de fibrina foram adicionados, unindo-os por meio do reparo término terminal (Figura 2C). Quando previsto no protocolo experimental, as CTMMO foram adicionadas. Após o procedimento, a musculatura foi reposicionada e a pele suturada.

Os neonatos foram mantidos junto às suas mães até o momento do desmame e foram observados até o momento das análises e posterior eutanásia.

Após o período de sobrevivência de 4, 8 ou 12 semanas, os animais foram anestesiados com uma combinação de Kensol (Xylasin 10mg/Kg, Koning, Argentina) e Vetaset (Ketamin, 50mg/Kg, Fort Dodge, USA) e em seguida submetidos à toracotomia. O sistema vascular foi perfundido transcardiacamente com tampão fosfato de sódio (pH 7,38). Os próximos passos respeitaram o tipo de técnica empregada na sequência.



**Figura 2. Procedimento de axotomia e reparo término-terminal.** **A.** as setas indicam o nervo isquiático exposto; **B.** transecção do nervo isquiático no grupo I, as setas indicam os cotos proximal e distal separados; **C.** transecção do nervo isquiático seguida da junção dos cotos com selante de fibrina nos grupos II (AX+SF), III (AX+SF+CTMMO) e V (AX+SFC). O círculo indica os cotos proximal e distal unidos.

#### 4.6. Sobrevivência neuronal

Após perfusão com salina (pH 7,38), os animais foram perfundidos com solução de formaldeído a 4% em tampão de sódio 0,1M (pH 7,38). A intumescência lombar foi dissecada e pós-fixada por 12 horas à 4°C. Após esse processo, foram lavadas com PB 0,1M (pH 7,38) e colocadas em frascos contendo solução de sacarose 10, 20 e 30% em PB 0,1M (pH 7,38) por 12 horas em cada e, em seguida, foram incluídas em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congeladas à temperatura de -35 a -40°C. Secções transversais da medula espinal com 12µm de espessura foram obtidas em criostato e posteriormente armazenadas a -20°C até o momento da utilização.

Para contagem de motoneurônios foram utilizadas as secções transversais da intumescência lombar coradas com cresil violeta (corante de Nissl). Os motoneurônios presentes no núcleo motor lateral do corno anterior no lado ipsilateral (lesado) e contralateral (não lesado) foram contados em cortes alternados de cada espécime em aproximadamente 20 secções, na área lesada da intumescência lombar, sendo o intervalo entre eles de 192µm. Apenas as células com núcleo e nucléolo visíveis foram contadas. Para corrigir contagens duplas de neurônios, foi utilizada a fórmula de Abercrombie e Johnson (93).

$$N=nt/(t+d)$$

Onde N é o número corrigido de neurônios contados, *n* é o número de células contadas, *t* é

a espessura das secções (192 $\mu$ m) e  $d$  é o diâmetro médio do neurônio. Como a diferença no tamanho afeta significativamente o número de células, o valor de  $d$  foi calculado especificamente para cada grupo experimental (ipsilateral e contralateral). Neste sentido, o diâmetro de motoneurônios para cada grupo foi mensurado (Image J, versão 1.33u, National Institute of Health, USA) e a média calculada.

#### **4.7. Imunoistoquímica para detecção e quantificação de sinaptofisina, astrogliose e reatividade da microglia, após procedimento de axotomia**

Para obtenção dos cortes da medula que foram analisados, foi realizado o mesmo procedimento descrito na técnica de sobrevivência neuronal.

Para a realização da imunoistoquímica, as lâminas foram inicialmente climatizadas, lavadas em solução de PB 0,1M (pH 7,4) e tratadas com solução de bloqueio (BSA 3%) por 1 hora. A seguir, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários camundongo anti-Sinaptofisina, coelho anti-GFAP e coelho anti-Iba1, todos em BSA 1%, e mantidos em câmara úmida, por 3 horas. Posteriormente à primeira incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PB 0,1M e incubadas com o anticorpo secundário Cy3 (Jackson Lab., USA), de acordo com a espécie do anticorpo primário, diluídos em BSA1% em PB por 45 minutos. Os espécimes foram lavados novamente em PB 0,1M e montados em glicerol/PB 0,1M (3:1), sendo analisadas posteriormente.

As análises de imunoistoquímica foram realizadas com os objetivos de:

- Detectar e quantificar a cobertura sináptica: foi utilizado o anticorpo primário camundongo anti-sinaptofisina (1:200, Dako), sendo esta proteína encontrada no interior de todos os terminais sinápticos ativos;
- Detectar e quantificar a astrogliose reativa: foi utilizado o anticorpo primário coelho anti-GFAP (1:1500, Abcam), sendo que esta proteína tem sua expressão aumentada após inúmeros tipos de lesões do sistema nervoso;



- Detectar e quantificar a reação microglial: foi utilizado o anticorpo primário coelho anti-Iba1 (1:1000, Santa Cruz), sendo que esta proteína tem sua expressão aumentada após lesão do sistema nervoso.

Para a realização das duplas marcações, com o intuito de se obter imagens qualitativas, foram aplicados os anticorpos primários descritos na tabela 1. A seguir, foram aplicados os anticorpos secundários pertinentes, conjugados com Cy2 ou Cy3 (Tabela 2). Para marcação dos núcleos celulares, utilizou-se DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), na diluição de 1 µl/mL.

**Tabela 1.** Lista de anticorpos primários utilizados para as duplas marcações de imunoistoquímica.

| <b>Anticorpo</b>   | <b>Animal</b> | <b>Diluição</b> | <b>Fonte/Código</b>  |
|--------------------|---------------|-----------------|----------------------|
| Anti-GFAP          | Rabbit        | 1/1.500         | Abcam/AB7779         |
| Anti-GFAP          | Mouse         | 1/500           | Abcam/AB4648         |
| Anti-Iba-1         | Rabbit        | 1/700           | Wako/019-19741       |
| Anti-NeuN          | Rabbit        | 1/500           | Millipore/ABN78      |
| Anti-NeuN          | Mouse         | 1/500           | Millipore/MAB377     |
| Anti-sinaptofisina | Mouse         | 1/1.500         | Millipore/MAB5258-50 |

**Tabela 2.** Lista de anticorpos secundários utilizados para as duplas marcações de imunoistoquímica.

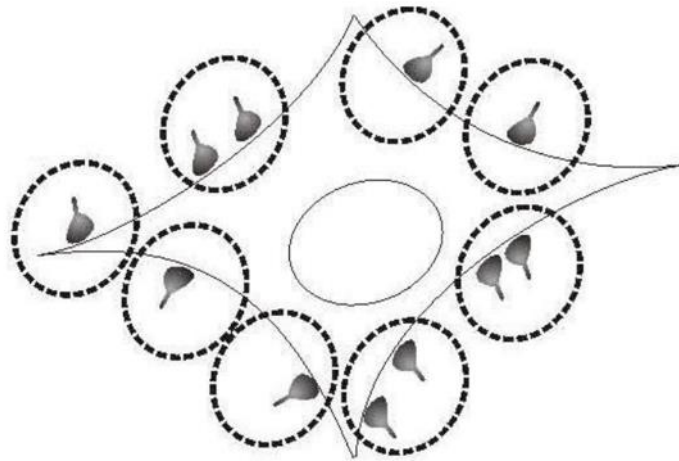
| <b>Anticorpo</b> | <b>Animal</b> | <b>Diluição</b> | <b>Fonte/Código</b>  |
|------------------|---------------|-----------------|----------------------|
| Cy3 anti-rabbit  | Donkey        | 1/500           | Jackson/ 711-165-152 |
| Cy2 anti-rabbit  | Donkey        | 1/500           | Jackson/ 711-225-152 |
| Cy3 anti-mouse   | Donkey        | 1/500           | Jackson/ 715-165-150 |
| Cy2 anti-mouse   | Goat          | 1/500           | Jackson/ 115-225-146 |

#### **4.7.1. Análise quantitativa dos resultados**

As lâminas imunomarcadas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon, eclipse TS 100) utilizando-se os filtros de rodamina (CY3). Para a quantificação, foram adquiridas três imagens representativas de cada lado (lesado e não lesado) da coluna anterior da medula espinal para cada animal, utilizando-se uma câmera de alta sensibilidade, acoplada ao microscópio (Nikon, DXM 1200F).

A densidade integrada de pixels, que representa a intensidade da imunomarcagem das proteínas, foi medida no corno anterior da medula espinal, utilizando-se a área total da imagem obtida para os anticorpos anti-GFAP e anti-IBA1. Já para o anticorpo anti-sinaptofisina, foi realizada

a medição de oito áreas equidistantes ao redor do motoneurônio, sendo quantificados dois motoneurônios por foto, de acordo com Emirandetti et al. (2010), como mostra a figura 3 (94). As imagens foram quantificadas utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). A proporção de densidade integrada de pixels foi calculada para cada animal e então estabelecida a média das proporções para cada grupo  $\pm$  erro padrão.



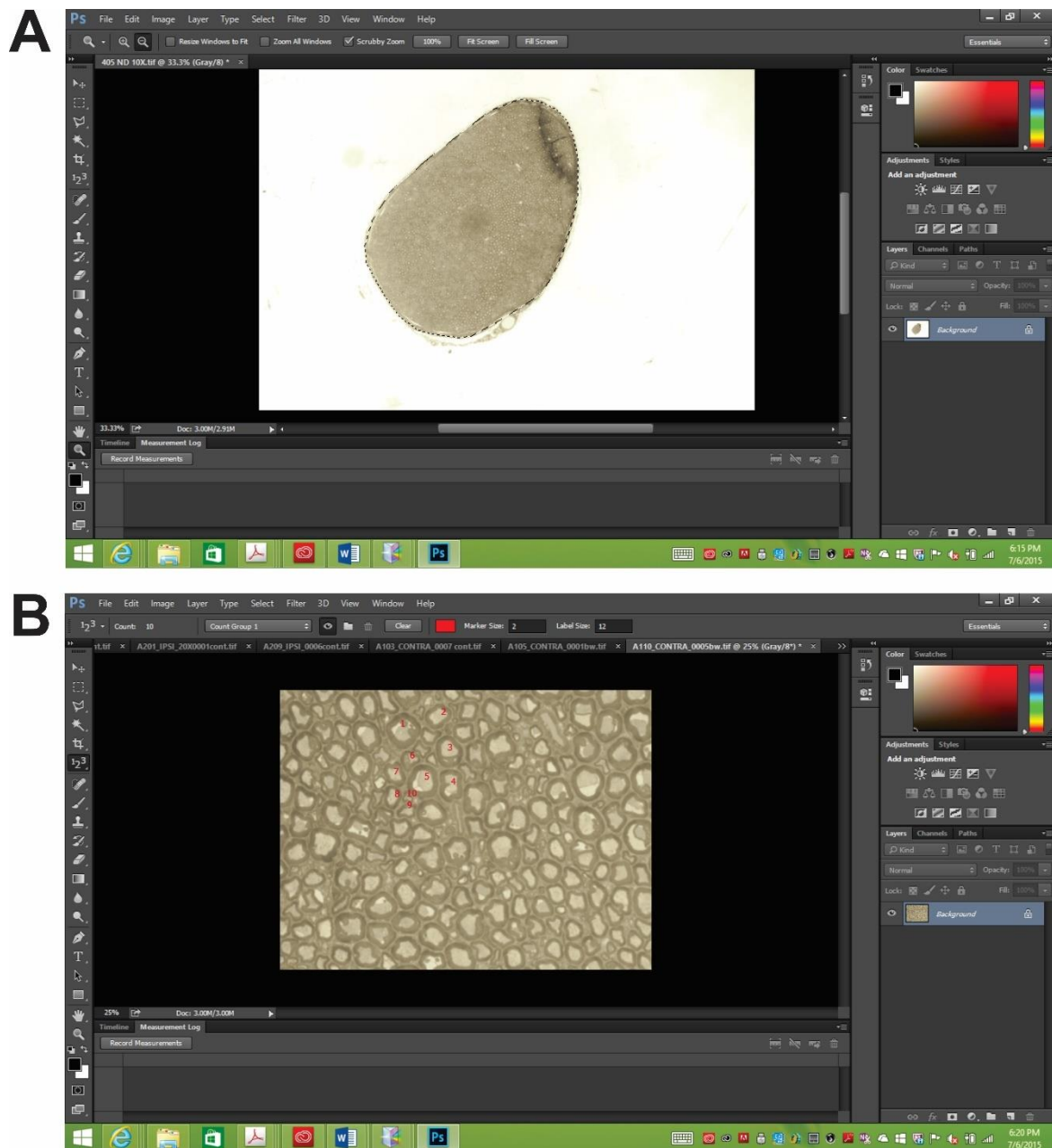
**Figura 3.** Esquema de um motoneurônio alfa (lâmina IX) com terminais em aposição. As linhas tracejadas representam as áreas onde foi medida a densidade integrada de pixels para o anticorpo anti-sinaptofisina. Figura retirada de Emirandetti et al. (2010) doi:10.1186/1742-2094-7-31 (94).

#### 4.8. Regeneração Nervosa

Após perfusão com salina (tampão de fosfato de Sódio) e Karnovsky (glutaraldeído 2% e paraformaldeído 1% em PB 0,1M, pH 7,38) o nervo isquiático contra e ipsilateral dos animais de todos os grupos foram expostos e dissecados. A porção distal do nervo, na região posterior da coxa, foi retirada e mantida na mesma solução fixadora por 24 horas a 4°C. Os fragmentos foram, então, lavados em salina tamponada e pós fixados por um período de 3 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio, pH 7,38. Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em séries crescentes de álcool e acetona, sendo incluídos em resina (Durcupan, Fluka). Os blocos foram desbastados e secções transversais semifinas (0,5 $\mu$ m) foram obtidas e analisadas após coloração com 0,7% de *Sudan*

*black* diluído em álcool 70%, em microscopia de luz. Cada secção (n=5 por grupo) foi digitalizada em microscópio óptico (NIKON DXM 1200i), sendo escolhida a objetiva de 10x para a observação da área total do nervo. Em seguida, imagens sequenciais foram digitalizadas na objetiva de 100x.

As análises de medida da área e contagem de axônios foram realizadas com o software Adobe Photoshop CS5. O número total de axônios em cada nervo foi calculado a partir da somatória do número de axônios obtidos em, no mínimo, 30% da área do nervo. O resultado final foi estimado a partir de uma regra de três simples, levando-se em consideração a área total do nervo (Figura 4).

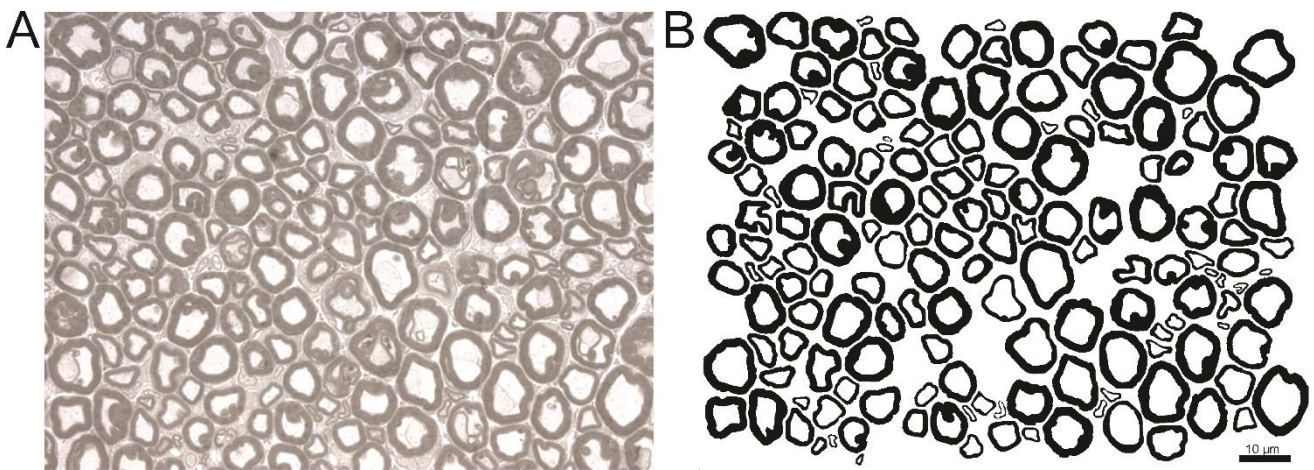


**Figura 4.** Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático. **A.** Cálculo da área total do nervo, observado na objetiva de 10X; **B.** contagem dos axônios, observados na objetiva de 100X.

#### 4.8.1. Avaliação Morfométrica do Nervo Isquiático

Para análise morfométrica, foram considerados os seguintes parâmetros: diâmetro das fibras mielínicas (DF), diâmetro dos axônios mielínicos (DAM), espessura da bainha de mielina (EBM) e razão "g" (RZG). A RZG consiste de um valor numérico que traz informações acerca do padrão de mielinização do nervo isquiático a partir da relação entre o DAM e o DF. A resposta

regenerativa axonal foi avaliada pelos resultados do DF e DAM. Os nervos foram analisados em aumento de 1000X para obtenção das medidas da morfometria, que foi realizada utilizando-se o programa Adobe Photoshop CS4 extended. As imagens foram convertidas em preto e branco e aplicou-se a ferramenta “limiar”. O background que não seria medido, bem como as fibras que não apareciam inteiras na figura foram apagadas, conforme ilustra a Figura 5. Todos os axônios foram selecionados de uma só vez através da ferramenta de seleção apropriada e as medidas foram feitas automaticamente pelo programa, após calibração do mesmo. A diferença entre o DF e o DAM dividido por dois foi empregada para obtenção da EBM (95).



**Figura 5.** Imagem do nervo isquiático em aumento de 1000X. **A.** Imagem, transformada em preto e branco. **B.** Mesma imagem, em que foi aplicado o limiar e apagado background e fibras que não apareciam inteiras na imagem original. Barra de escala: 10µm.

#### **4.9. Avaliação ultraestrutural da medula espinal**

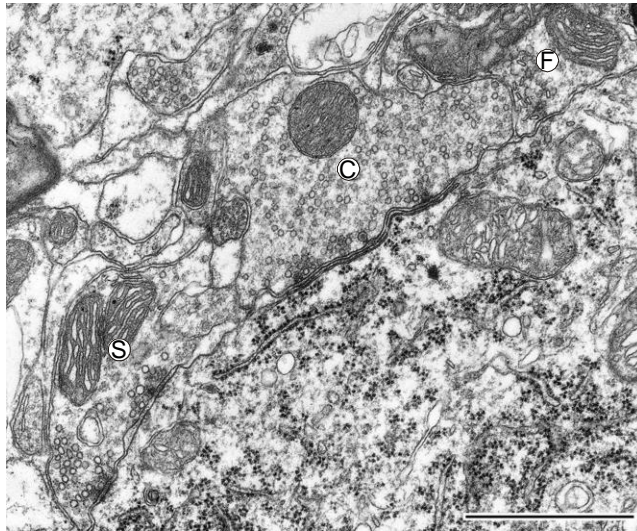
Após perfusão com salina e Karnovsky (glutaraldeído 2% e paraformaldeído 1% em PB 0,1M, pH 7,4) a intumescência lombar foi dissecada e pós-fixada por 12 horas, imersos na solução fixadora à 4°C e então lavados em tampão fosfato 0,1M (pH 7,38). As medulas foram seccionadas longitudinalmente, através da fissura mediana anterior e, então, pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M, (pH7,38) por 4 horas. Seguindo-se a pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em série

crescente de álcool e acetona, sendo incluídos em resina (Durcupan ACM, Fluka). Os blocos foram desbastados e secções semifinas (0,5 µm) foram obtidas e analisadas após coloração com azul de toluidina 0,25%, com o objetivo de localizar os neurônios do grupo motor lateral da coluna ventral da medula, ao microscópio óptico. Localizados estes neurônios, os blocos foram retrimados para o isolamento da região contendo os motoneurônios a serem analisados. Em seguida, secções ultra-finas com 70nm de espessura (500Å; ultramicrotomo Leica Ultracut- UCT) foram realizadas, coletadas em grids de cobre ("single slot grids") revestidos com formvar, contrastadas com acetato de uranila 2% durante 20 minutos e citrato de chumbo por 4 minutos, e analisadas ao microscópio eletrônico *Tecnai Biotwin G2 Spirit, FEI Company, Holanda*, operando a 120KV.

#### **4.9.1. Análise da medula espinal nas secções ultra-finas**

Neurônios com grandes corpos celulares (>35 µm de diâmetro) encontrados no grupo motor lateral da coluna ventral da medula espinal e seccionados ao nível do plano nuclear foram identificados como motoneurônios alfa medulares, pela presença de pelo menos um terminal colinérgico (tipo C) (96). Os neurônios foram identificados como lesados observando-se modificações no corpo celular. Após, a superfície das células foi digitalizada sequencialmente em aumento de 11.000X, empregando-se uma videocâmara (Eagle) conectada a um sistema computadorizado (Fei Company, Holanda). Os terminais sinápticos em contato com o corpo celular dos motoneurônios, bem como dos dendritos proximais foram identificados em: F- com vesículas achatadas e especializações sinápticas simétricas, S- com vesículas esféricas e especializações sinápticas assimétricas e C- com cisterna sub-sináptica e colinérgicos, de acordo com a nomenclatura de Conradi (1969) (96) (Figura 6). Após a identificação, os terminais foram medidos por meio do programa Image J (versão 1.33u, National Institute of Health, USA), quantificados por 100 µm de membrana e pela porcentagem de cobertura sináptica (medindo-se a extensão dos terminais em contato com o motoneurônio). Também foi quantificada a distância entre os terminais nervosos cobrindo os motoneurônios (GAPs).





**Figura 6.** Eletromicrografia do microambiente sináptico mostrando os três tipos de terminais pré-sinápticos em aposição à membrana de um motoneurônio alfa medular. Terminais C, S e F, em destaque (Sabha et al, 2008).

#### **4.10. Avaliação motora**

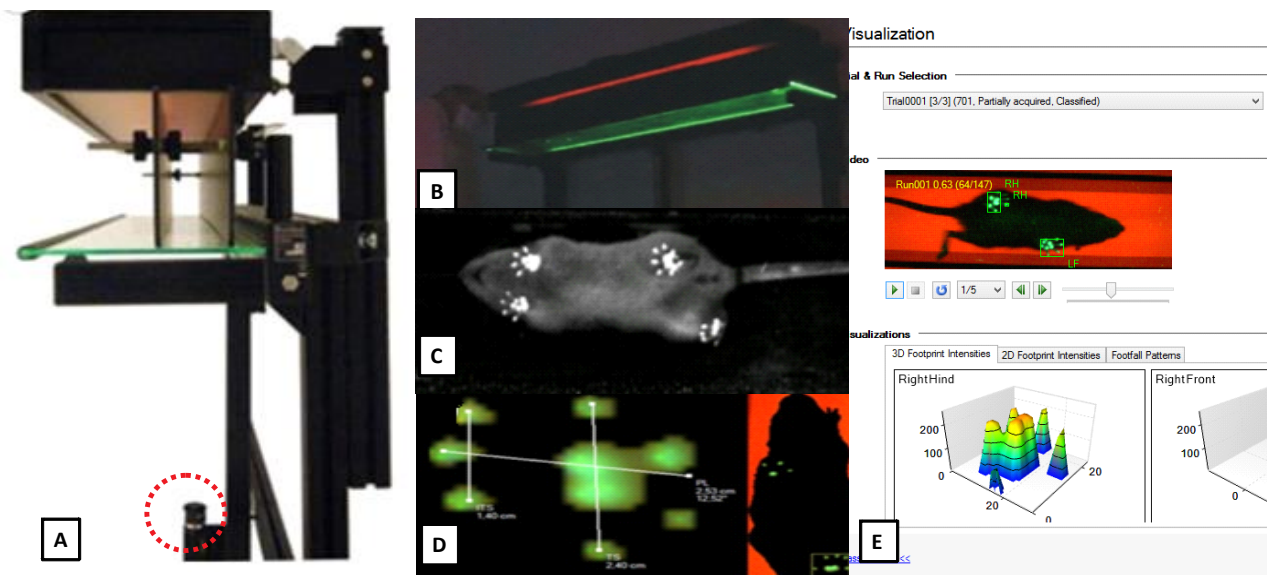
##### **4.10.1. Avaliação motora da recuperação funcional**

Os animais foram colocados para caminhar ao longo de uma plataforma com um assoalho de vidro (100 cm comprimento x 15 cm largura x 0.6 cm espessura) localizado em uma sala escura. Uma lâmpada fluorescente marcou somente onde havia pontos de contato no assoalho de vidro, ou seja, pressão das patas dos animais caminhando (Figura 7). A intensidade do sinal varia de acordo com a pressão aplicada pela pata do animal e, quanto maior a pressão exercida, maior o contato da pele com o assoalho e, conseqüentemente, maior o brilho dos pixels. O programa CatWalk adquiriu, armazenou e permitiu a análise dos vídeos dos animais caminhando pelo corredor. As medições foram feitas de acordo com a intensidade da pressão exercida pela pegada. Para isso, foram utilizados os valores da média das razões dos lados ipsi/contralateral das impressões plantares. Foi avaliado o Índice de recuperação do nervo fibular, que é um ramo terminal do nervo isquiático, pois não foi possível adquirir a medida entre o segundo e o quarto dedos, necessária para o cálculo do Índice funcional do nervo isquiático. Para o cálculo do índice de recuperação motora do nervo fibular (FFI), as medições foram feitas de acordo com dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo (toe spread, TS) e a distância entre o

terceiro dedo e o calcanhar (print length, PL). Estes parâmetros foram utilizados para a medição das pegadas das patas posterior direita (lesada) e posterior esquerda (normal) e os valores aplicados na seguinte fórmula, descrita por Bain e colaboradores em 1989 (97):

$$\text{FFI} = 174.9 \times ((\text{ETS}-\text{NTS})/\text{NTS}) + 80.3 \times ((\text{EPL}-\text{NPL})/\text{NPL}) - 13.4$$

(E = lado lesionado, N = lado normal)



**Figura 7.** Sistema Catwalk. **A.** Foto do equipamento, com a câmera de alta resolução em destaque. **B.** Plataforma onde os ratos caminham. **C and D.** Sistema em operação, com as patas destacadas. **E.** Dados adquiridos durante o teste. Fonte: <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/catwalk>.

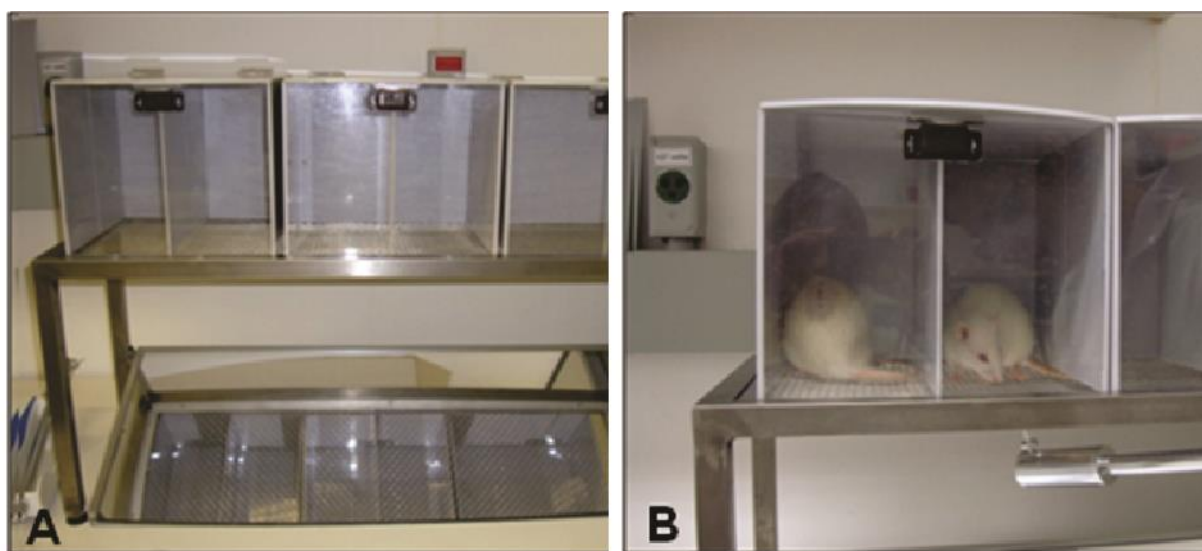
## 4.11. Avaliação sensitiva

### 4.11.1. Teste nociceptivo comportamental (von Frey eletrônico)

O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado por um analgesímetro eletrônico inicialmente desenvolvido para humanos (98) e adaptado para ratos (99) e camundongos (100). O analgesímetro eletrônico consiste em um transdutor de força conectado a um contador digital que expressa a força em gramas (gf). A precisão do aparelho é de 0,5 gf e está calibrado para registrar



uma força máxima de 150 gf, mantendo a precisão de 0,5 gf até a força de 80 gf. O contato do transdutor de força com a pata foi realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12x20x17 cm, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm<sup>2</sup>, constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura. Os ratos permaneceram nas caixas durante 20 minutos antes do experimento para ambientação. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas (Figura 8). Foi aplicado, por entre as malhas da rede, uma pressão na superfície plantar da pata dos ratos com um aumento constante, até que o rato emitisse um reflexo de retirada da pata, seguido de uma resposta caracterizada como tremor (—flinchll) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral, até que o animal apresentasse quatro medidas consecutivas similares, ou seja, com uma diferença de força inferior ou igual a 10%. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada pela análise do limiar de nocicepção, em gramas, obtida pela média dos valores obtidos após a cirurgia, por dia de teste.



**Figura 8.** Teste sensitivo (von Frey eletrônico). **A.** Caixas onde são colocados os ratos, arame não maleável abaixo das caixas e espelho. **B.** Pipeta de plástico acoplada ao transdutor de força que é aplicado sob a região plantar do animal.

#### **4.12. Análise estatística dos resultados**

A partir dos resultados numéricos resultantes de todas as análises, foram calculados a média e erro padrão para cada grupo. Os dados foram avaliados pelo método da análise da variância – ANOVA de uma via, enquanto que os dados da análise funcional foram avaliados pelo método da análise da variância – ANOVA de duas vias. Nos dois casos foi realizado pós-teste Bonferroni. Diferenças entre as médias dos grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

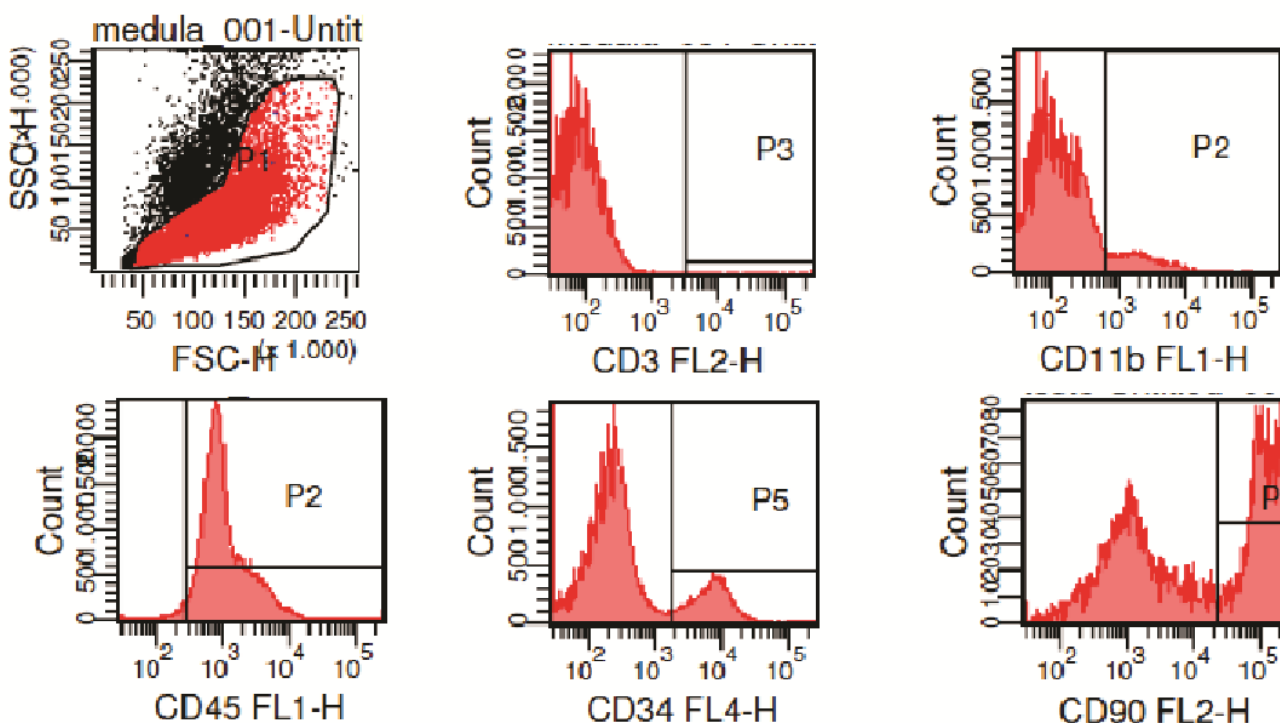
### **5. Resultados**

#### **5.1. Ensaio de viabilidade celular**

Com o objetivo de avaliar a viabilidade das células tronco, foi realizada a contagem celular durante 48h após extração, mantendo-as em duas condições de armazenamento (4 e 37°C). A densidade celular da alíquota que permaneceu na incubadora e a que permaneceu sob refrigeração foi a mesma 2h após a extração. Entretanto, após 4h, o número de células diminuiu 90% nas que estavam mantidas na incubadora e 20% nas que estavam sob refrigeração e, com o passar das horas, mesmo as células que estavam refrigeradas tiveram a viabilidade reduzida. Portanto, padronizamos em transplantar as células somente no dia da extração, mantendo-as refrigeradas até pouco antes do uso.

#### **5.2. Caracterização das CTMMO**

A análise quantitativa foi realizada através de ensaios de citometria de fluxo, utilizando-se os anticorpos marcadores anti-CD11b, CD3, CD34, CD45, CD90 (Figura 9).



**Figura 9.** Histograma da população de células-tronco mononucleares positivas para cada marcador de superfície. Análise por citometria de fluxo.

O marcador para células hematopoiéticas progenitoras, CD45 (96,8%), CD34 (19,1% dos CD45 marcados) e CD90 (57,4%), apresentaram maior porcentagem nos eventos analisados, mostrando que a extração de células foi realizada adequadamente e que a população de células de interesse é homogênea. A porcentagem de linfócitos T presentes (CD3+) foi de 0,2%, de monócitos (CD11b) foi de 10,8%.

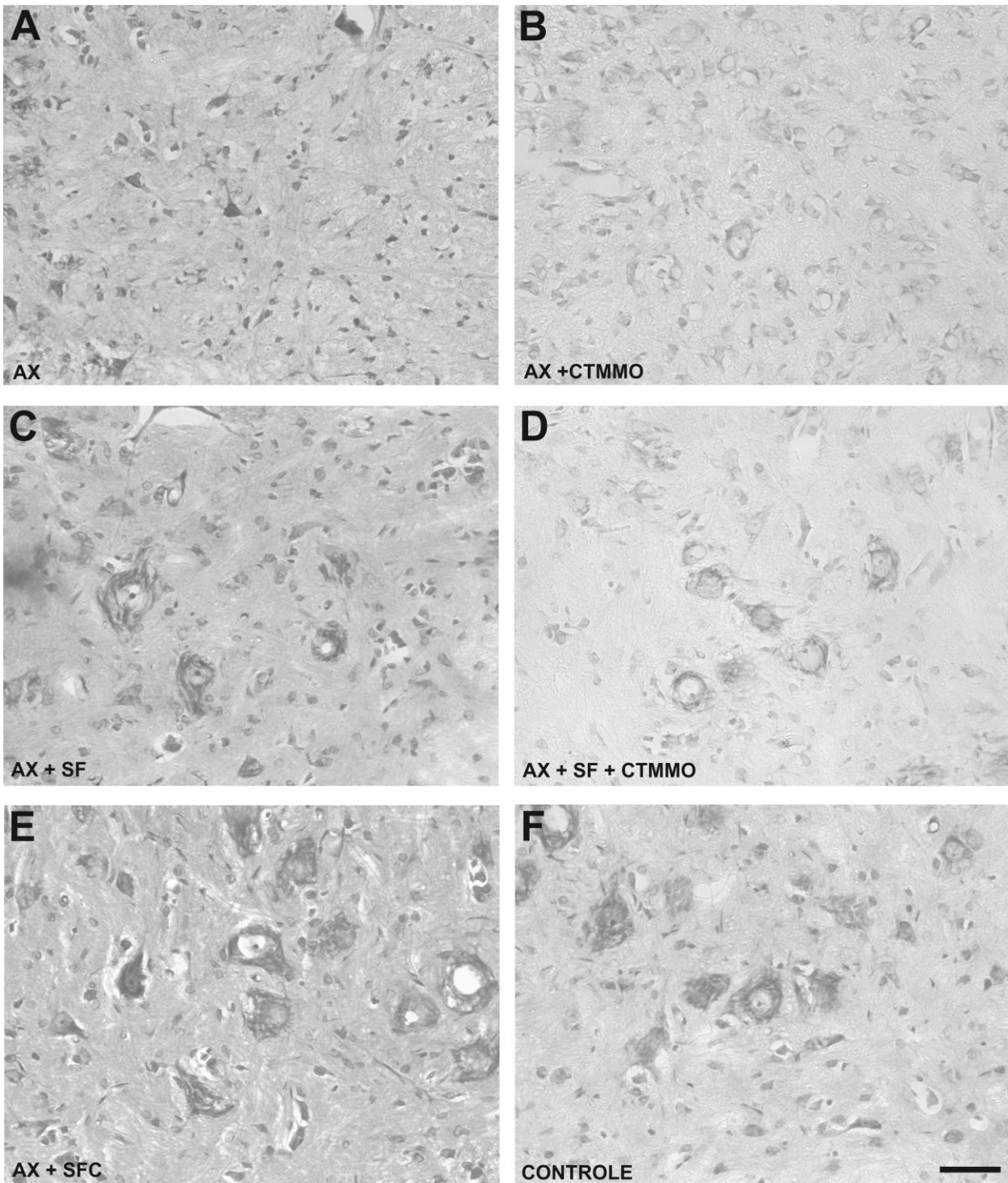
### 5.3. Sobrevivência Neuronal

O efeito do reparo com selante de fibrina foi analisado determinando-se a porcentagem de sobrevivência neuronal (razão percentual entre o número de motoneurônios ipsi e contralateral à lesão). Após 4, 8 e 12 semanas, ocorreu intensa degeneração dos motoneurônios lesados no núcleo motor dos animais dos grupos em que foi realizada apenas a axotomia (AX) e nos animais que foi realizada a axotomia seguida de tratamento com células tronco (AX+CTMMO). Por outro lado, observa-se no lado ipsilateral do grupo que foi realizado o reparo com selante de fibrina

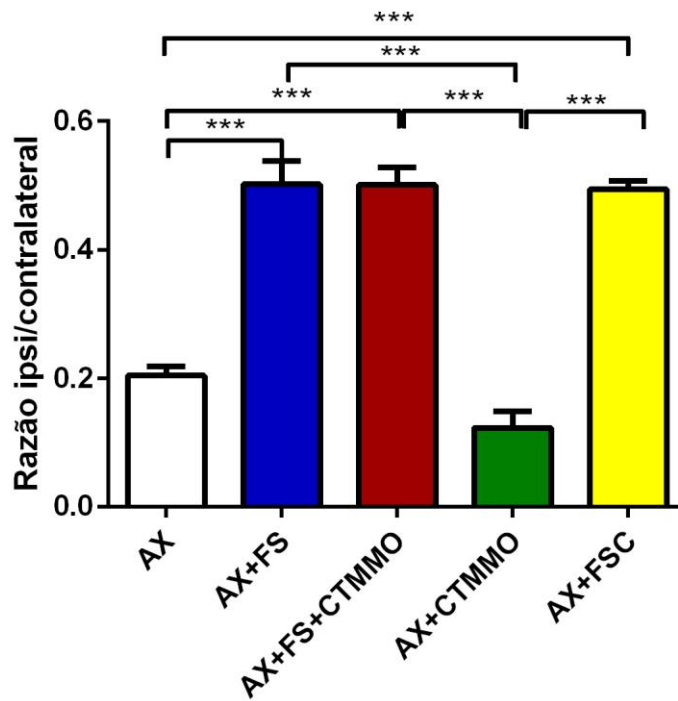
(AX+SF), no que foi realizado tratamento células tronco pós reparo (AX+SF+CTMMO) e no que foi realizado o reparo com selante de fibrina comercial (AX+SFC), a presença de motoneurônios com grande corpo celular e um número significativamente maior de neurônios sobreviventes (Figuras 10, 12 e 14). Calculou-se ainda, a razão percentual entre o número de motoneurônios presentes no lado ipsi e contralateral, obtendo-se as porcentagens de sobrevivência neuronal apresentadas na tabela 3 e nas figuras 11, 13 e 15. Ao se comparar a sobrevivência neuronal em um mesmo grupo, 4, 8 e 12 semanas após a lesão, observou-se que não há diferença nos diferentes tempos de sobrevividas.

**Tabela 3.** Razão percentual entre o número de motoneurônios presentes no lado ipsi e contralateral em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão.

| Semanas pós lesão | Grupo I<br>AX    | Grupo II<br>AX+SF | Grupo III<br>AX+SF+CTMMO | Grupo IV<br>AX+CTMMO | Grupo V<br>AX+SFC |
|-------------------|------------------|-------------------|--------------------------|----------------------|-------------------|
| 4S                | 20,4 $\pm$ 1,40% | 50,2 $\pm$ 3,68%  | 50,1 $\pm$ 2,66%         | 12,3 $\pm$ 2,52%     | 49,4 $\pm$ 1,24%  |
| 8S                | 18,2 $\pm$ 2,67% | 43,6 $\pm$ 2,24%  | 41,0 $\pm$ 3,01%         | 17,6 $\pm$ 1,77%     | 53,1 $\pm$ 3,72%  |
| 12S               | 16,8 $\pm$ 1,47% | 47,4 $\pm$ 1,34%  | 48,3 $\pm$ 1,94%         | 17,0 $\pm$ 2,82%     | 48,9 $\pm$ 3,39%  |

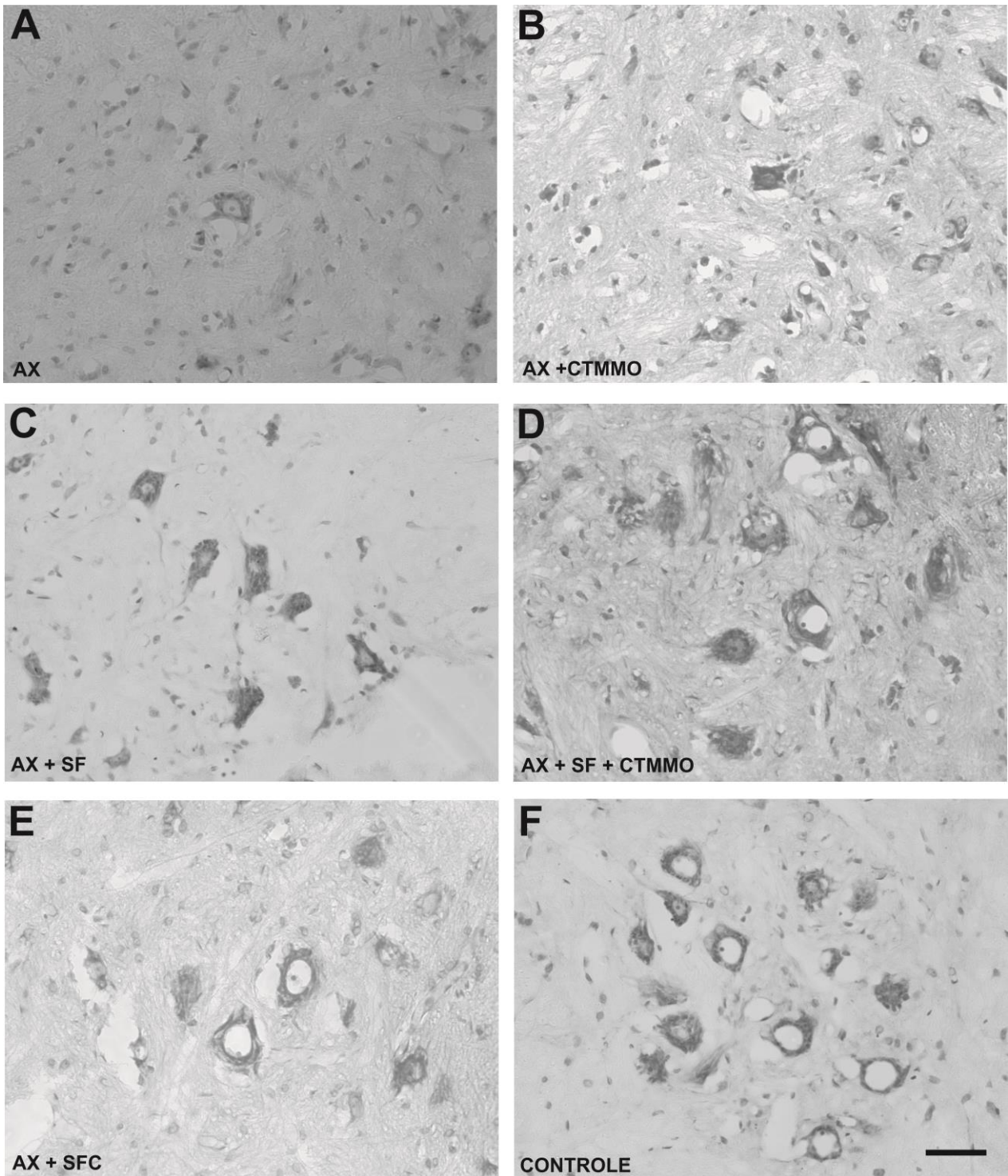


**Figura 10.** Cortes histológicas da região da medula lombar do núcleo motor lateral do corno ventral corados com a técnica de Nissl, 4 semanas após a axotomia do nervo isquiático. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

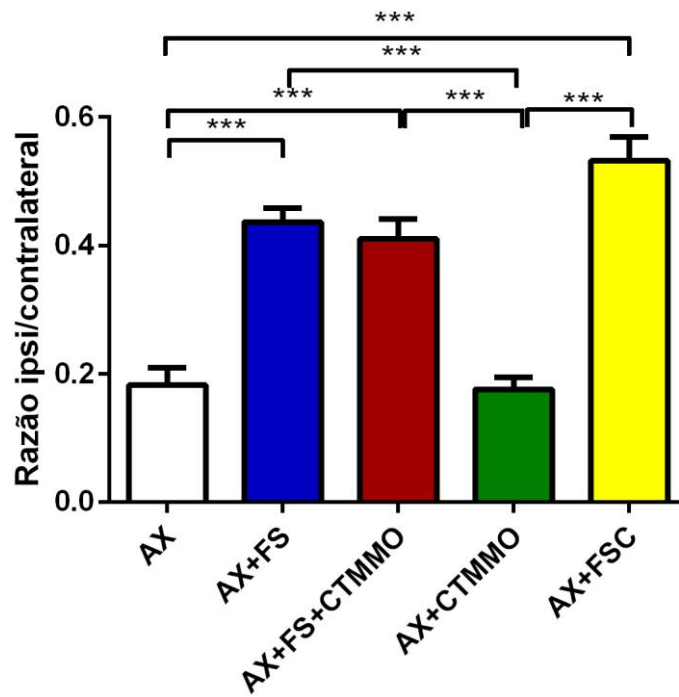


**Figura 11.** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 4 semanas após a axotomia do nervo isquiático. AX- axotomia; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial (\*\*p <0.001).



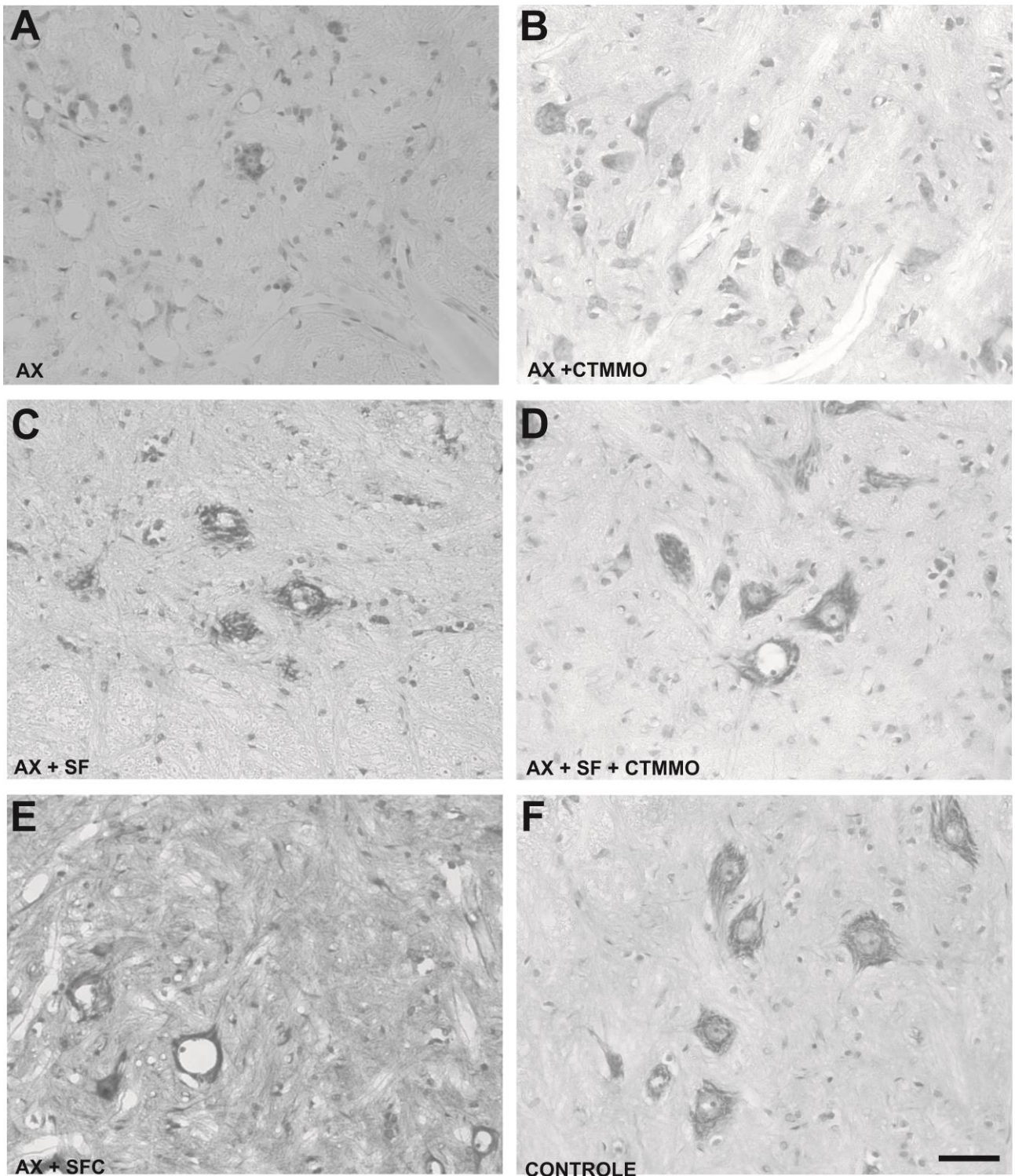


**Figura 12.** Cortes histológicas transversais da região da medula lombar do núcleo motor lateral do corno ventral corados com a técnica de Nissl, 8 semanas após a axotomia do nervo isquiático. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

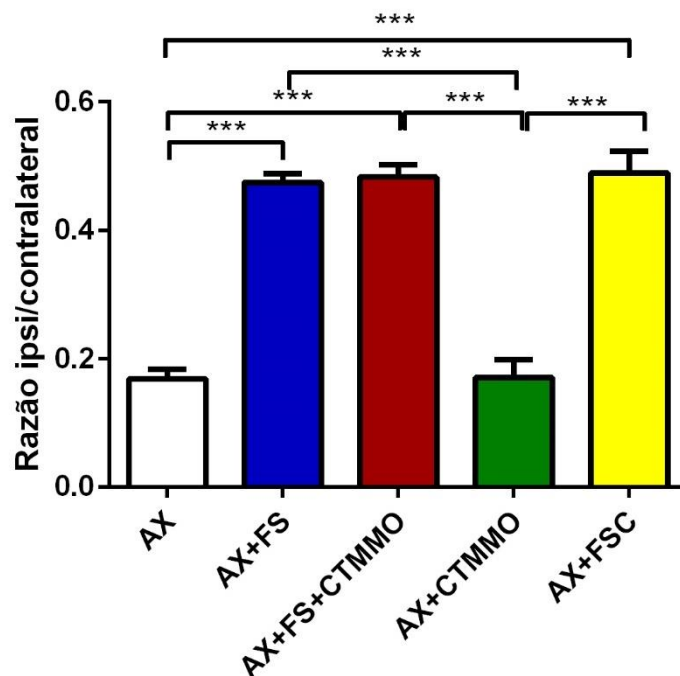


**Figura 13.** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 8 semanas após a axotomia do nervo isquiático. AX- axotomia; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial (\*\**p* <0.001).





**Figura 14.** Cortes histológicas transversais da região da medula lombar do núcleo motor lateral do corno ventral corados com a técnica de Nissl, 12 semanas após a axotomia do nervo isquiático. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

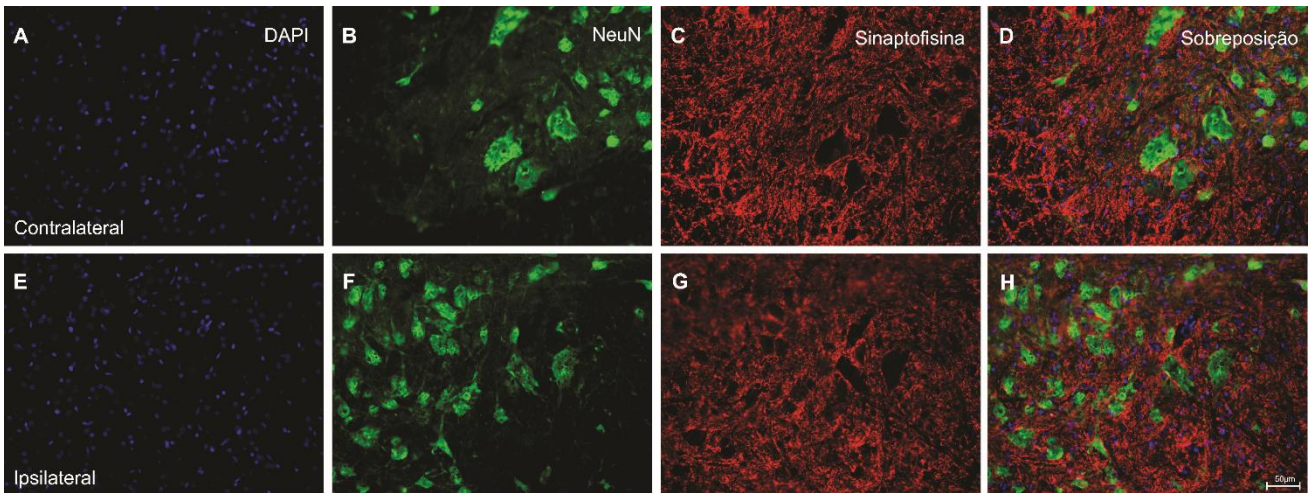


**Figura 15.** Representação gráfica da porcentagem de sobrevivência neuronal, 12 semanas após a axotomia do nervo isquiático. AX- axotomia; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial (\*\*p < 0.001).

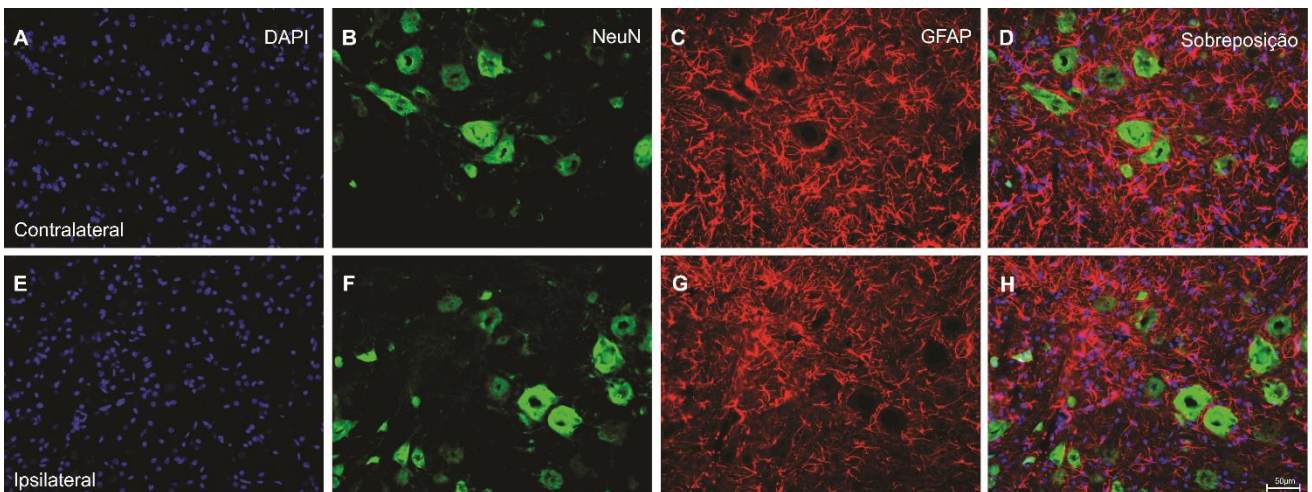
#### 5.4. Imunoistoquímica

Com o objetivo de ilustrar o que ocorre no microambiente medular após uma lesão, foram realizadas duplas marcações em secções provenientes do grupo axotomia, 4 semanas após a lesão (imagens ilustrativas). A figura 16 apresenta a dupla marcação (NeuN / Sinaptofisina), mostrando que a cobertura sináptica diminuiu ao redor dos motoneurônios no lado ipsilateral. A figura 17 apresenta a dupla marcação (NeuN / GFAP) evidenciando a interação dos astrócitos e a figura 18 apresenta a interação da microglia (NeuN / Iba-1), após lesão. Todas as duplas marcações foram associadas à citoquímica com DAPI (marcador de núcleo celular). Além disso, foi realizada dupla marcação com os anticorpos anti-GFAP e anti-Iba-1, evidenciando que ambos atuam tornando-se mais reativos após a lesão (Figura 19).



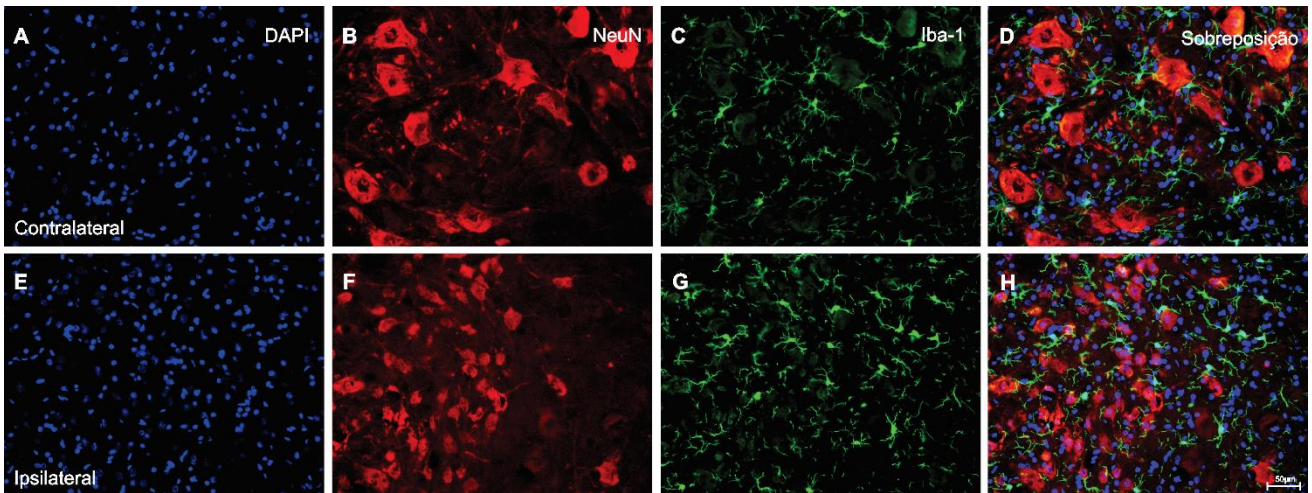


**Figura 16.** Dupla marcação (NeuN / Sinaptofisina) associada à citoquímica com DAPI, em secções provenientes do grupo Axotomia (imagens ilustrativas) onde, núcleos celulares são visualizados em azul (DAPI), neurônios em verde (NeuN) e sinaptofisina em vermelho. **A-D.** imagens ampliadas da região da lâmina IX onde estão localizados os grupos de motoneurônios medulares do lado contralateral à lesão. **E-H.** imagens do grupo de motoneurônios medulares do lado ipsilateral à lesão. Barra de escala = 50µm.

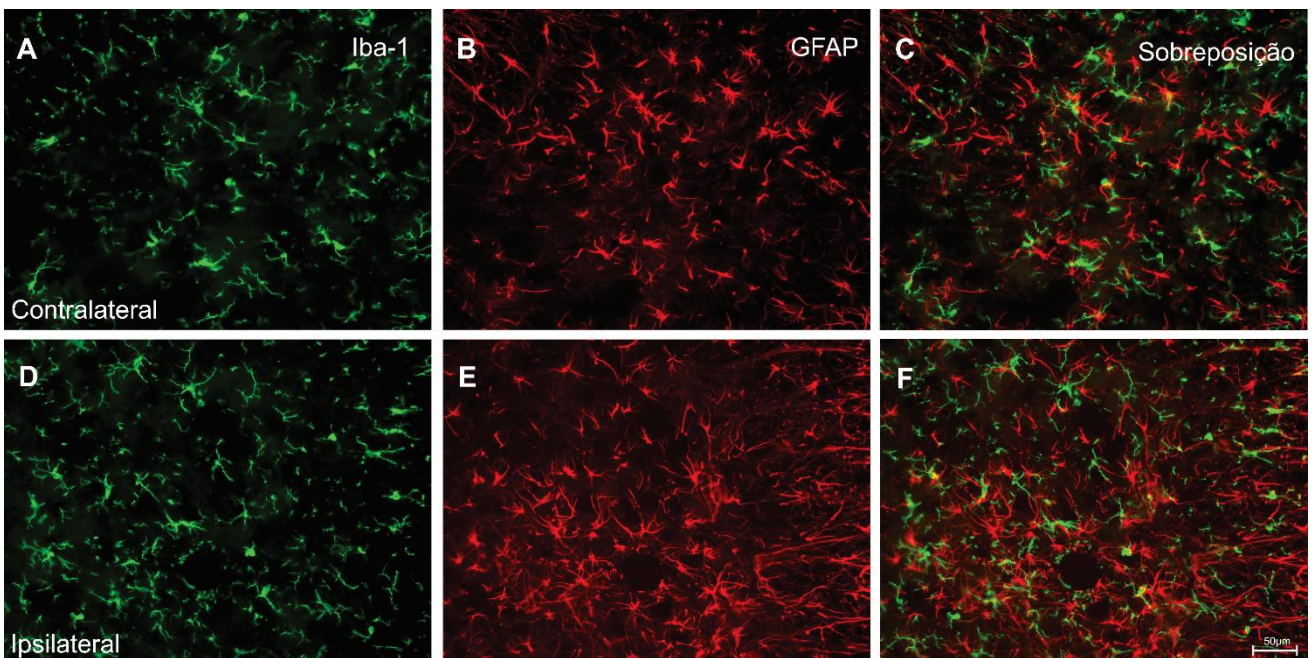


**Figura 17.** Dupla marcação (NeuN / GFAP) associada à citoquímica com DAPI, em secções provenientes do grupo Axotomia (imagens ilustrativas) onde, núcleos celulares são visualizados em azul (DAPI), neurônios em verde (NeuN) e GFAP em vermelho. **A-D.** imagens ampliadas da região da lâmina IX onde estão localizados os grupos de motoneurônios medulares do lado contralateral à lesão. **E-H.** imagens do grupo de motoneurônios medulares do lado ipsilateral à lesão. Barra de escala = 50µm.





**Figura 18.** Dupla marcação (NeuN / Iba-1) associada à citoquímica com DAPI, em secções provenientes do grupo Axotomia (imagens ilustrativas) onde, núcleos celulares são visualizados em azul (DAPI), neurônios em vermelho (NeuN) e Iba-1 em verde. **A-D.** imagens ampliadas da região da lâmina IX onde estão localizados os grupos de motoneurônios medulares do lado contralateral à lesão. **E-H.** imagens do grupo de motoneurônios medulares do lado ipsilateral à lesão. Barra de escala = 50µm.



**Figura 19.** Dupla marcação (Iba-1 / GFAP), em secções provenientes do grupo Axotomia (imagens ilustrativas) onde, Iba-1 é visualizado em verde e GFAP em vermelho. **A-C.** imagens ampliadas da região da lâmina IX onde estão localizados os grupos de motoneurônios medulares do lado contralateral à lesão. **D-F.** imagens do grupo de motoneurônios medulares do lado ipsilateral à lesão. Barra de escala = 50µm.

### 5.4.1. Cobertura Sináptica

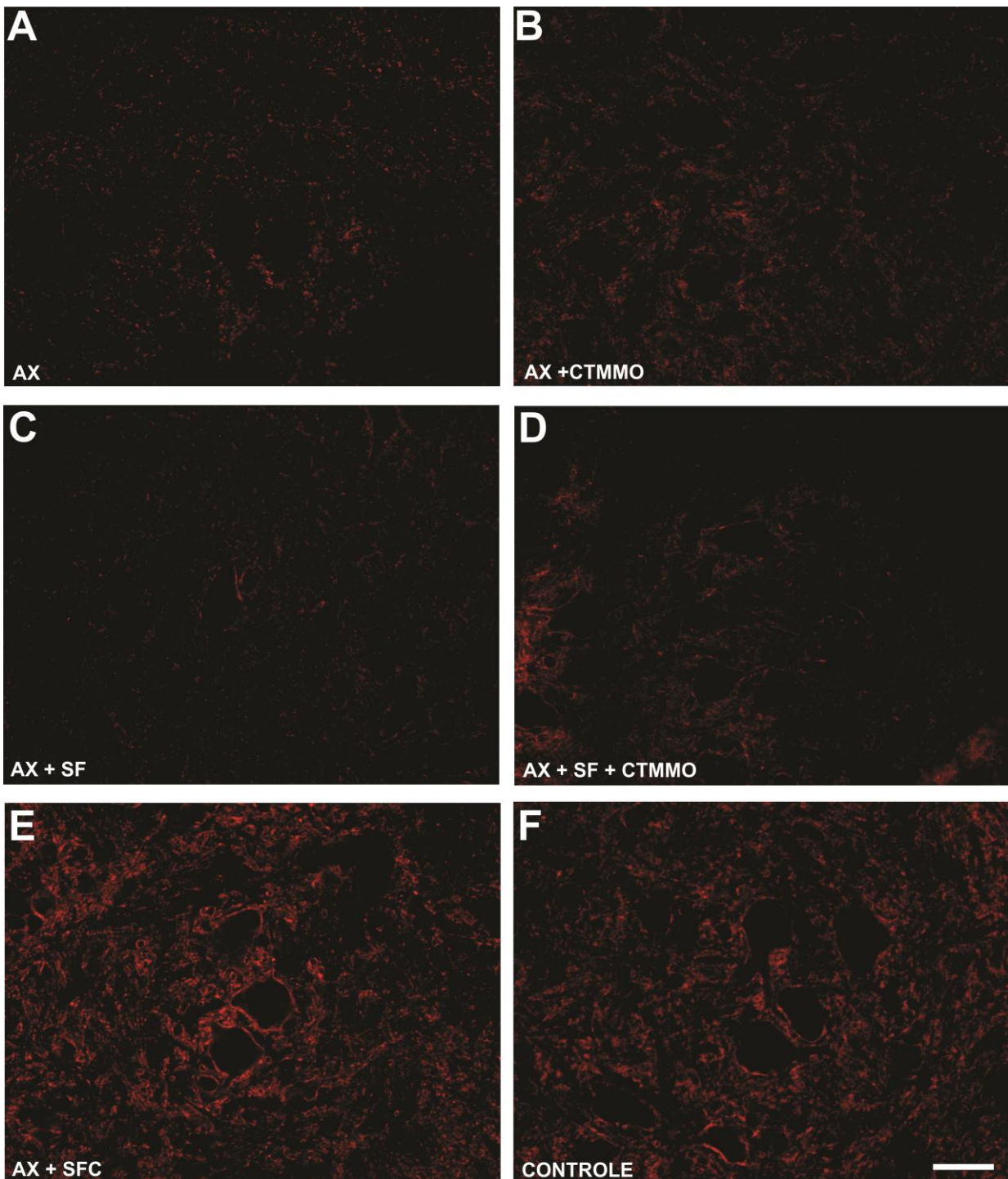
A análise das mudanças sinápticas, seja pela sua manutenção ou pela sua redução, após a transecção do nervo isquiático, foi realizada pela técnica de imunistoquímica. Foi analisada a presença da proteína sinaptofisina no núcleo motor lateral, do corno ventral da medula espinal, na região da lâmina IX, 4, 8 e 12 semanas após a lesão. Esta observação baseou-se em uma avaliação quantitativa da cobertura sináptica através da densidade integrada de pixels, que reflete a intensidade da imunomarcagem em oito pontos ao redor de dois motoneurônios por animal. A cobertura sináptica foi significativamente preservada no microambiente circunjacente aos motoneurônios da medula espinal nos grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC em todos os períodos analisados (Figuras 20, 22 e 24). Calculou-se a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo, apresentadas na tabela 4 e nas figuras 21, 23 e 25 (média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcagem  $\pm$  erro padrão)  $p < 0,0001$ .

Ao se comparar a cobertura sináptica em um mesmo grupo, 4, 8 e 12 semanas após a lesão, observou-se que não há diferença nos diferentes tempos de sobrevivência.

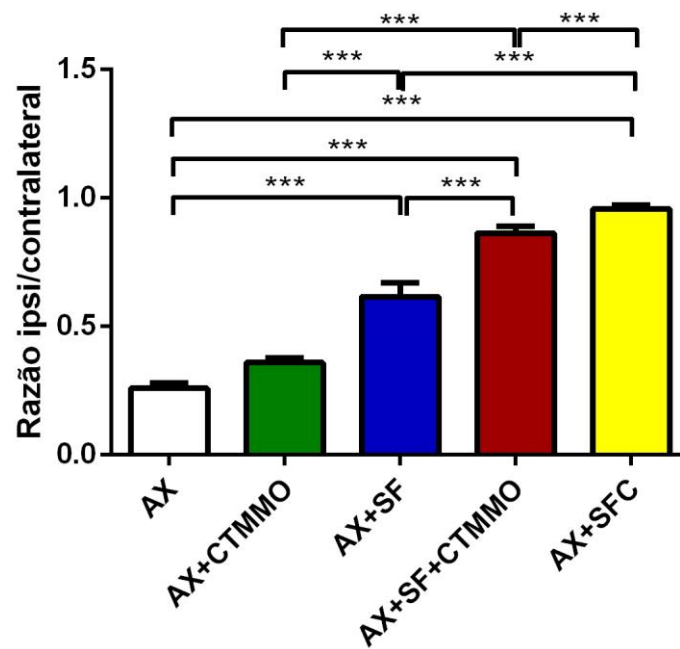
**Tabela 4.** Razão percentual da densidade integrada de pixels do anticorpo anti-Sinaptofisina entre os lados ipsi e contralateral em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão.

| Semanas pós lesão | Grupo I AX      | Grupo II AX+SF  | Grupo III AX+SF+CTMMO | Grupo IV AX+CTMMO | Grupo V AX+SFC  |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-----------------|
| 4S                | 0,25 $\pm$ 0,02 | 0,61 $\pm$ 0,05 | 0,86 $\pm$ 0,02       | 0,36 $\pm$ 0,01   | 0,95 $\pm$ 0,01 |
| 8S                | 0,41 $\pm$ 0,03 | 0,71 $\pm$ 0,05 | 0,70 $\pm$ 0,05       | 0,34 $\pm$ 0,02   | 0,87 $\pm$ 0,03 |
| 12S               | 0,35 $\pm$ 0,01 | 0,79 $\pm$ 0,05 | 0,69 $\pm$ 0,04       | 0,39 $\pm$ 0,03   | 0,88 $\pm$ 0,03 |

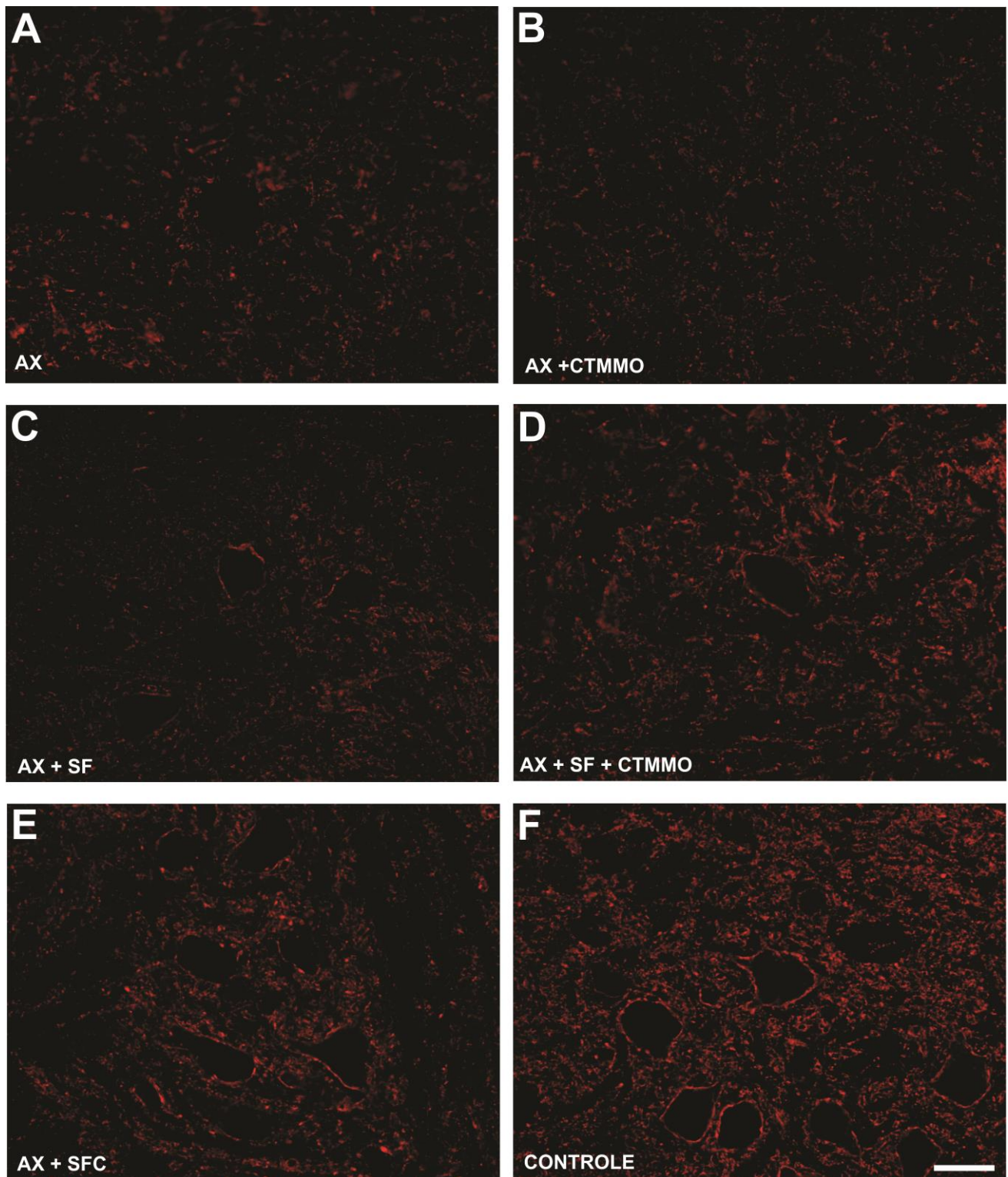




**Figura 20.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinaptofisina, 4 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

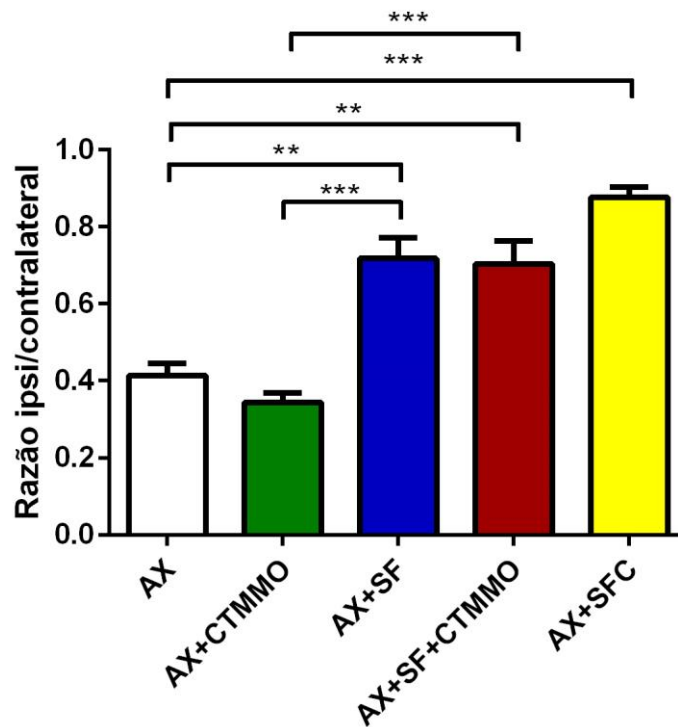


**Figura 21.** Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica, 4 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*\*\*) $p < 0.001$ ).

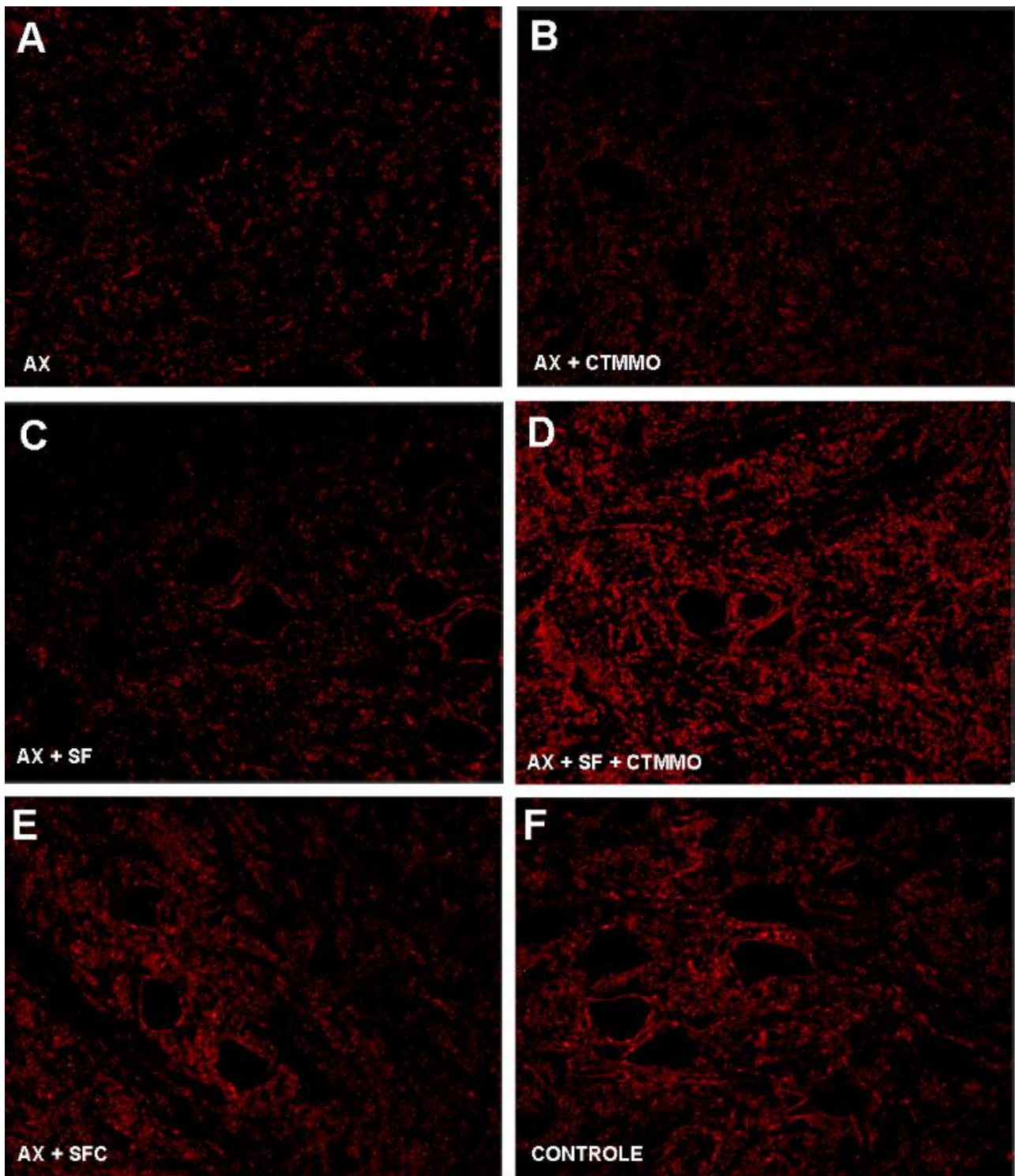


**Figura 22.** Análise imunohistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinaptofisina, 8 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50 $\mu$ m.

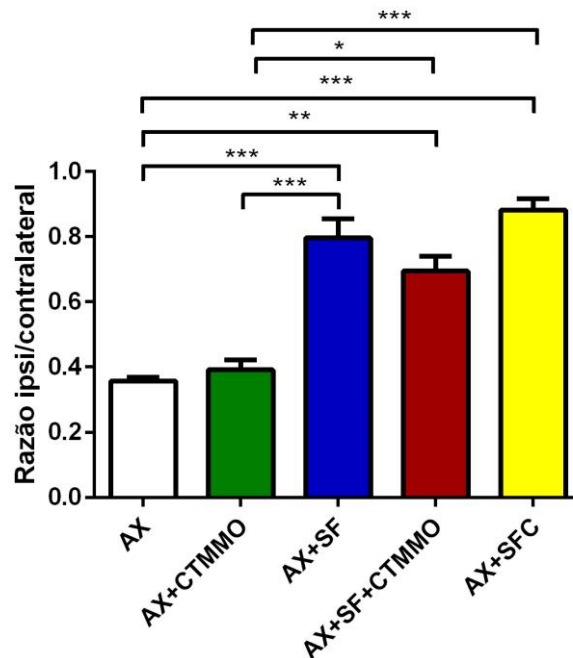




**Figura 23.** Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica, 8 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- - axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).



**Figura 24.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-sinaptofisina, 12 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.



**Figura 25.** Representação gráfica da quantificação da cobertura sináptica, 12 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).

#### 5.4.2. Reatividade Glial

Para analisar as mudanças no microambiente ao redor dos motoneurônios medulares lesados, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica para avaliar a imunoreatividade anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein), marcador da astrogliose reativa.

A reatividade astrogliar diminuiu após o reparo somente com selante de fibrina ou quando este foi combinado com tratamento de CTMMO, assim como no grupo com selante de fibrina comercial, quatro semanas após a lesão (Figuras 26, 28 e 30). Observou-se que nos tempos de sobrevivência de oito e 12 semanas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Calculou-se a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo, apresentadas na tabela 3 e figuras 27, 29 e 31 (média da razão ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão  $\pm$  erro padrão)  $p < 0,0001$ .

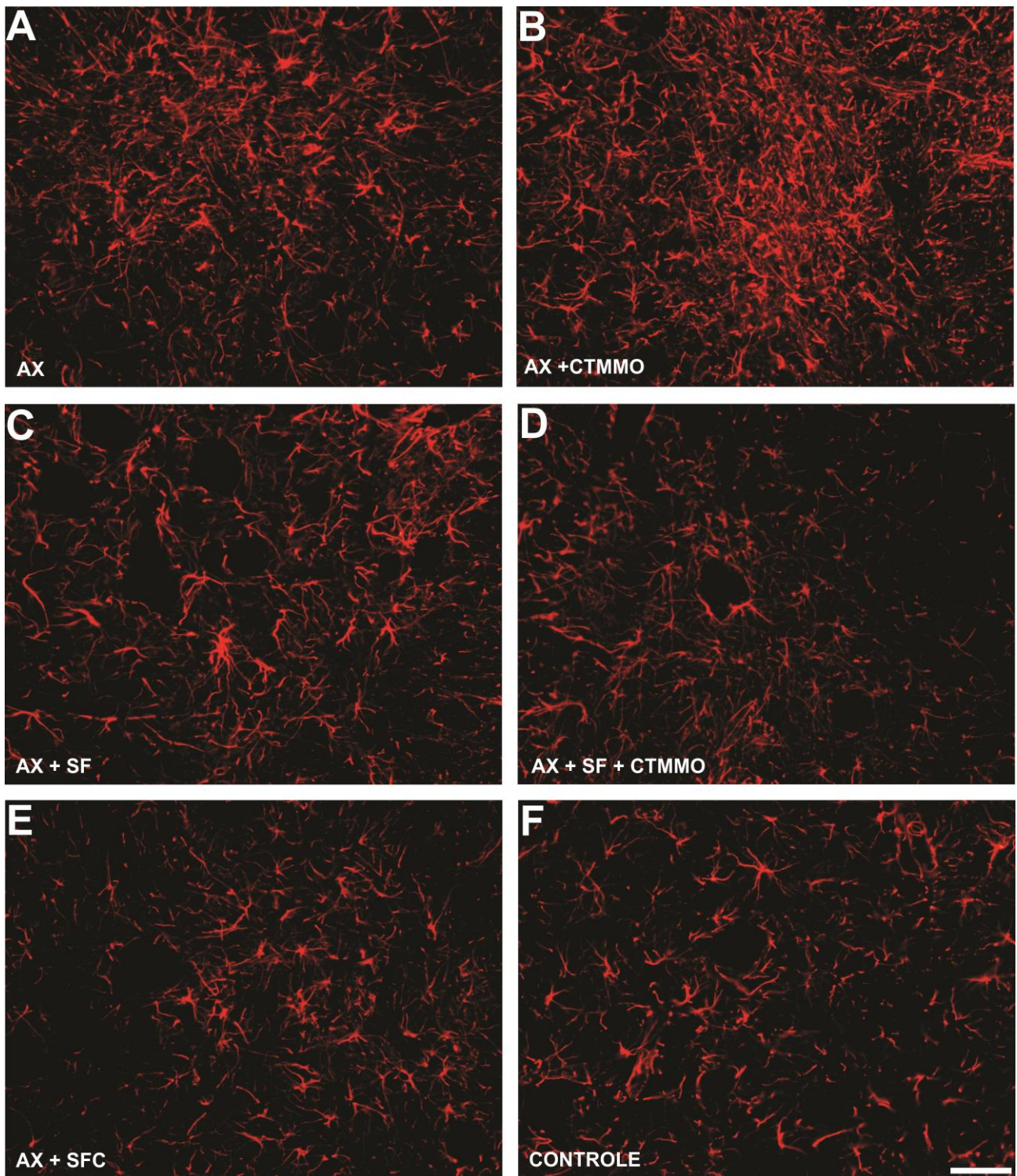
Ao se comparar a sobrevivência neuronal em um mesmo grupo, 4, 8 e 12 semanas após a

lesão, observou-se que não há diferença nos diferentes tempos de sobrevividas.

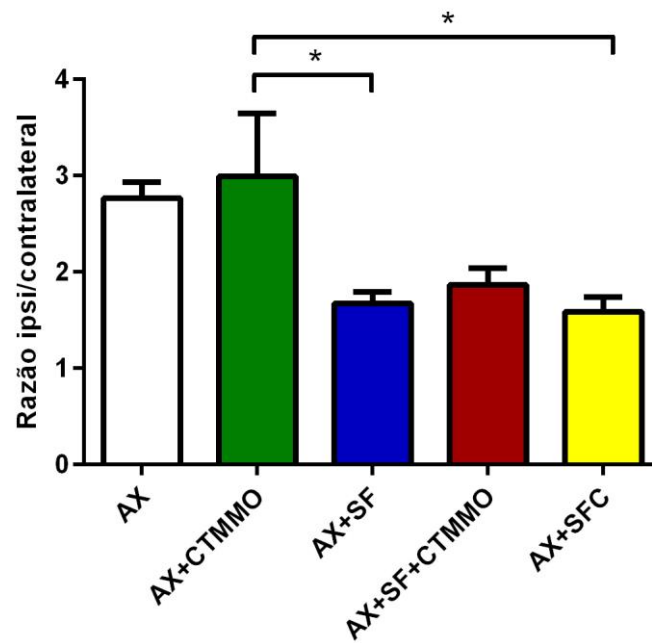
**Tabela 5.** Razão percentual da densidade integrada de pixels, do anticorpo anti-GFAP, entre os lados ipsi e contralateral em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão.

| <b>Semanas<br/>pós lesão</b> | <b>Grupo I<br/>AX</b> | <b>Grupo II<br/>AX+SF</b> | <b>Grupo III<br/>AX+SF+CTMMO</b> | <b>Grupo IV<br/>AX+CTMMO</b> | <b>Grupo V<br/>AX+SFC</b> |
|------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| <b>4S</b>                    | 2,12 $\pm$ 0,18       | 1,67 $\pm$ 0,12           | 1,86 $\pm$ 0,17                  | 2,99 $\pm$ 0,65              | 1,58 $\pm$ 0,15           |
| <b>8S</b>                    | 1,78 $\pm$ 0,20       | 1,30 $\pm$ 0,10           | 1,42 $\pm$ 0,12                  | 1,62 $\pm$ 0,13              | 1,31 $\pm$ 0,08           |
| <b>12S</b>                   | 1,62 $\pm$ 0,08       | 1,37 $\pm$ 0,10           | 1,40 $\pm$ 0,02                  | 1,44 $\pm$ 0,29              | 1,51 $\pm$ 0,15           |



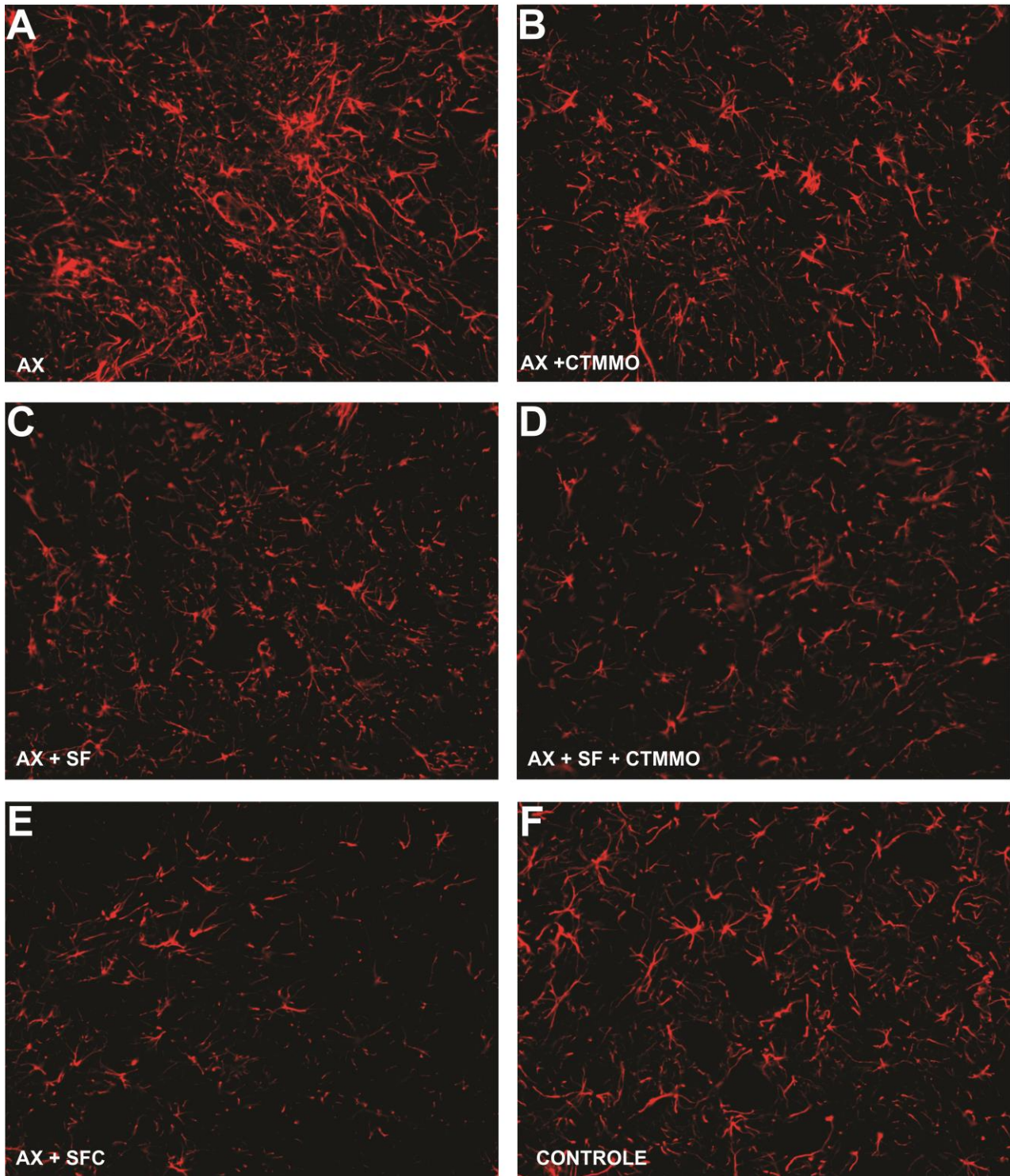


**Figura 26.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-GFAP, 4 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

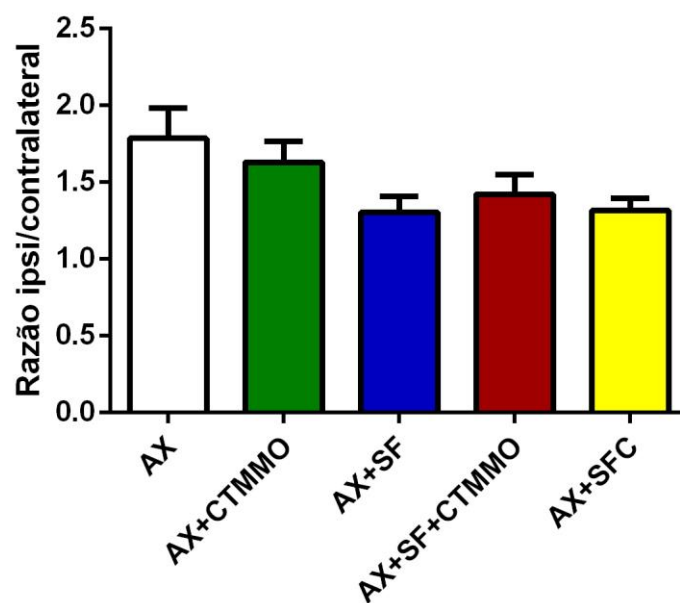


**Figura 27.** Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa, 4 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\* $p < 0.05$ ).



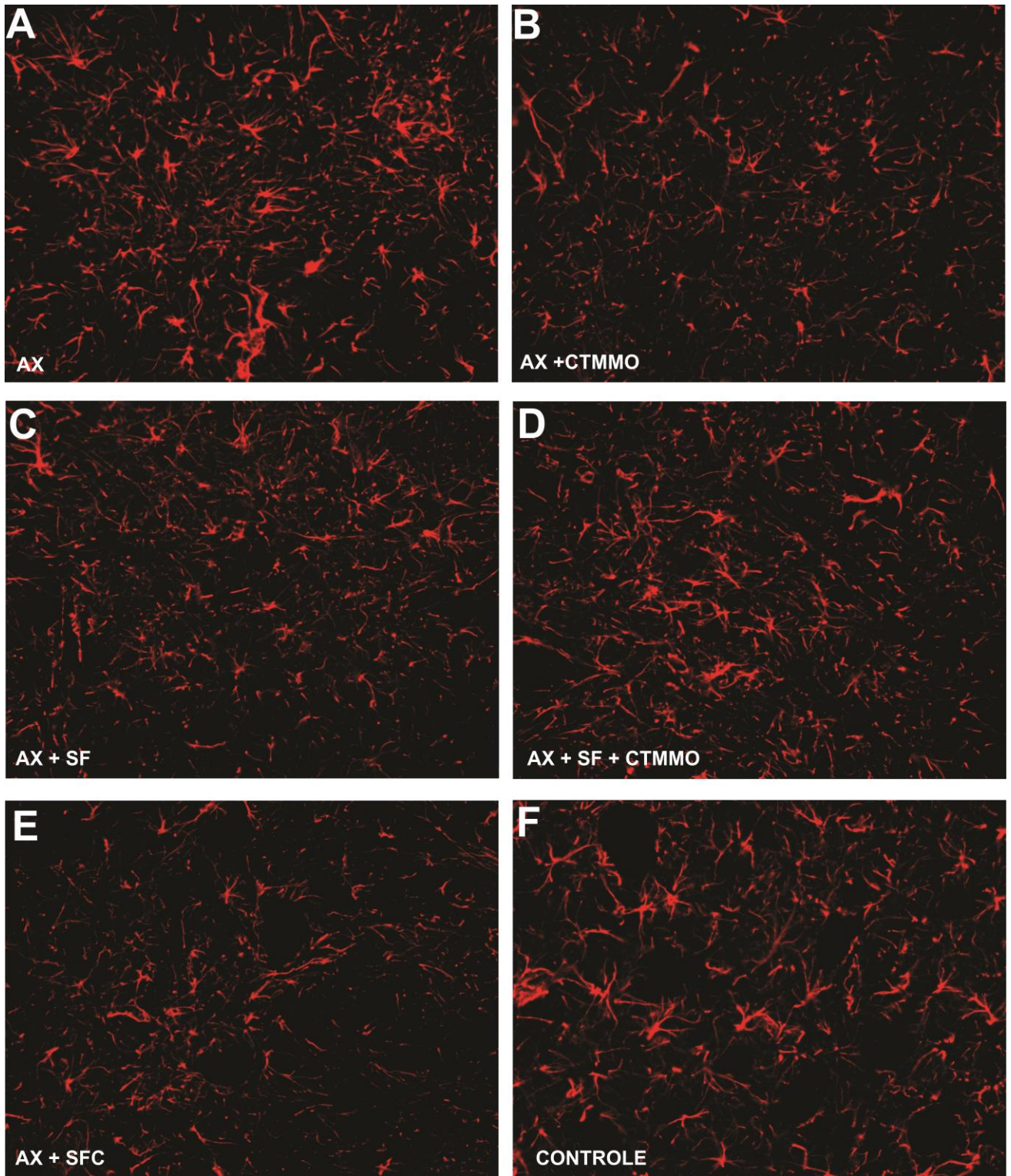


**Figura 28.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-GFAP, 8 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.

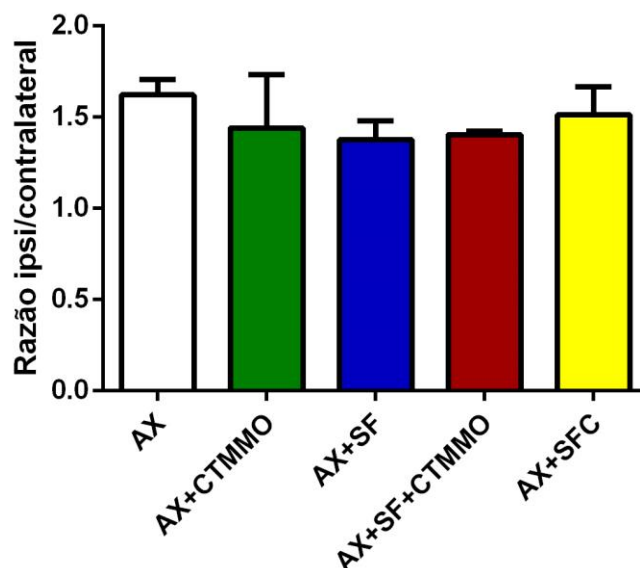


**Figura 29.** Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa, 8 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial.





**Figura 30.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-GFAP, 12 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.



**Figura 31.** Representação gráfica da quantificação da astrogliose reativa, 12 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial.

### 5.4.3. Reatividade Microglial

Para analisar as mudanças no microambiente ao redor dos motoneurônios medulares lesados, foi utilizada a técnica de imunistoquímica para avaliar a imunoreatividade anti-Iba 1 (ionized calcium binding adaptor molecule). A reação microglial foi regulada quando o reparo com selante de fibrina foi combinado com células tronco ou não e também no grupo que foi utilizado o selante de fibrina comercial, quatro semanas pós-lesão (Figura 32). Com oito semanas de sobrevivência, o grupo em que foi realizada a axotomia e apenas o tratamento com células tronco, sem o reparo com selante de fibrina, teve uma imunoreatividade maior comparado aos outros grupos (Figura 34). Com doze semanas de sobrevivência, todos os grupos apresentaram a mesma resposta (Figura 36). Esta observação baseou-se em uma avaliação quantitativa da densidade integrada de pixels, que reflete a intensidade da imunomarcagem. Foi calculada a razão percentual da densidade integrada de pixels entre os lados ipsi e contralateral de cada grupo, obtendo-se as porcentagens de atividade microglial, descritas na tabela 6 e nas figuras 33, 35 e 37 (média da razão

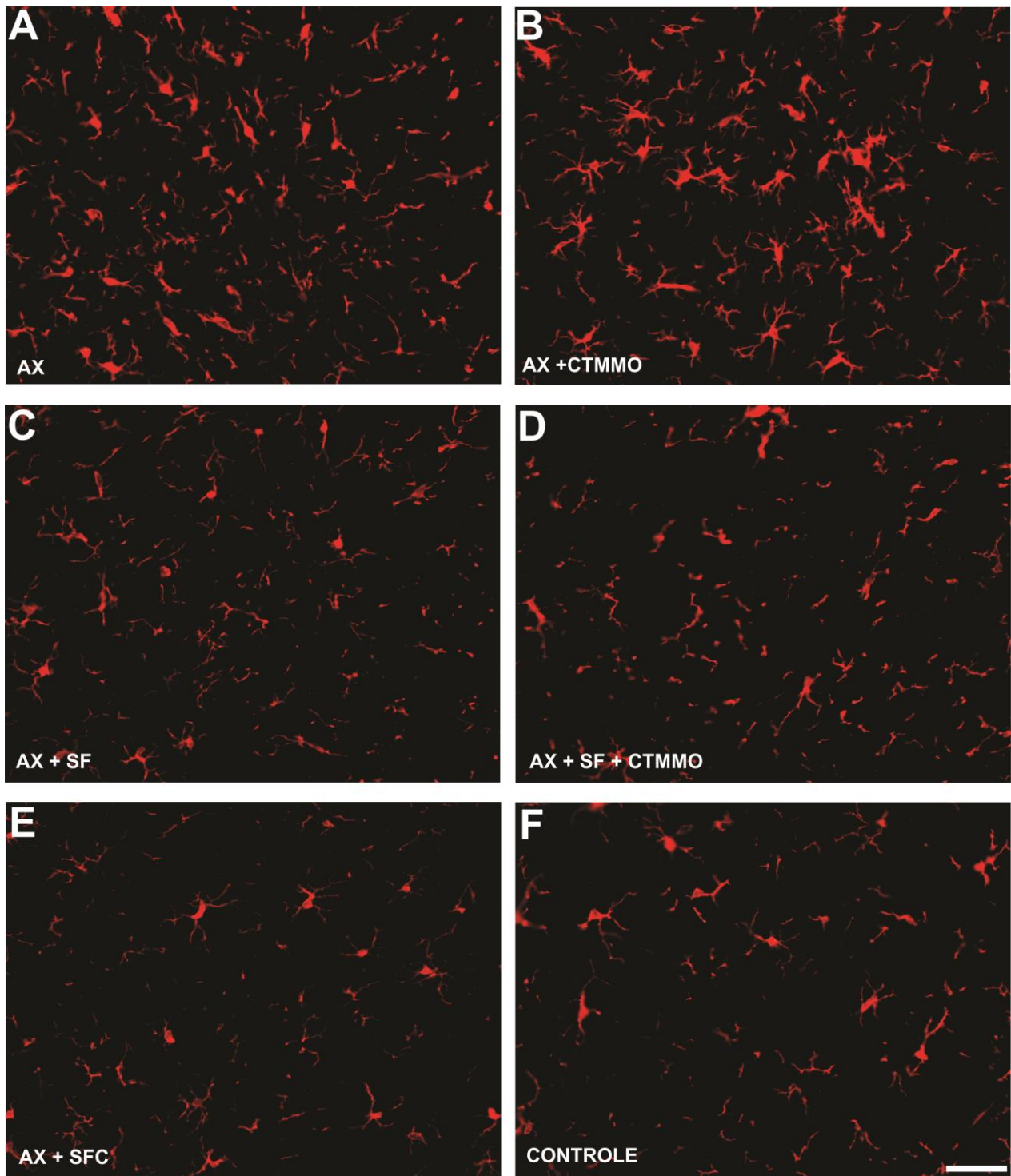
ipsi/contralateral da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcção ± erro padrão)  
 $p < 0,0001$ .

Ao se comparar a reatividade microglial em um mesmo grupo, 4, 8 e 12 semanas após a lesão, observou-se que não há diferença nos diferentes tempos de sobrevivência.

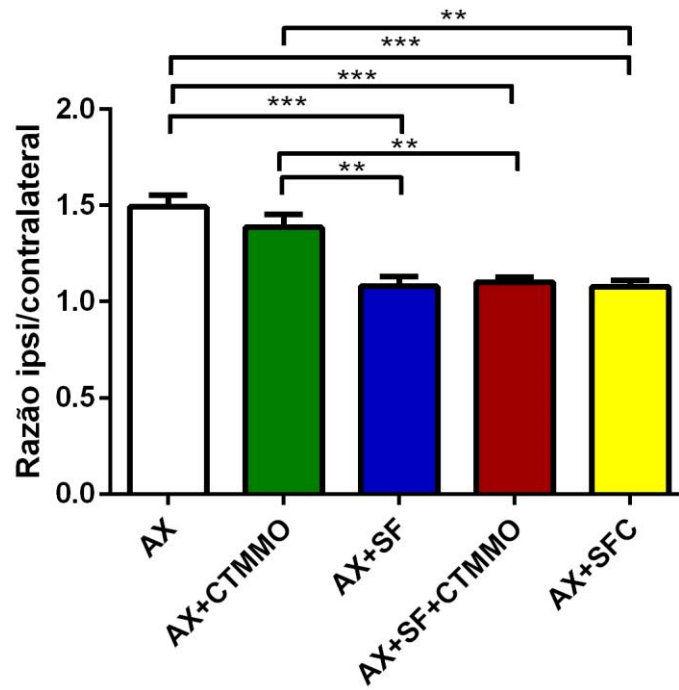
**Tabela 6.** Razão percentual da densidade integrada de pixels, do anticorpo anti-Iba1, entre os lados ipsi e contralateral em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo ± erro padrão.

| <b>Semanas pós lesão</b> | <b>Grupo I AX</b> | <b>Grupo II AX+SF</b> | <b>Grupo III AX+SF+CTMMO</b> | <b>Grupo IV AX+CTMMO</b> | <b>Grupo V AX+SFC</b> |
|--------------------------|-------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <b>4S</b>                | 1,49±0,06         | 1,07±0,05             | 1,10±0,02                    | 1,25±0,02                | 1,07±0,03             |
| <b>8S</b>                | 1,21±0,09         | 1,14±0,05             | 1,30±0,12                    | 1,58±0,09                | 1,19±0,08             |
| <b>12S</b>               | 0,90±0,27         | 1,24±0,04             | 1,45±0,09                    | 1,34±0,09                | 1,51±0,05             |

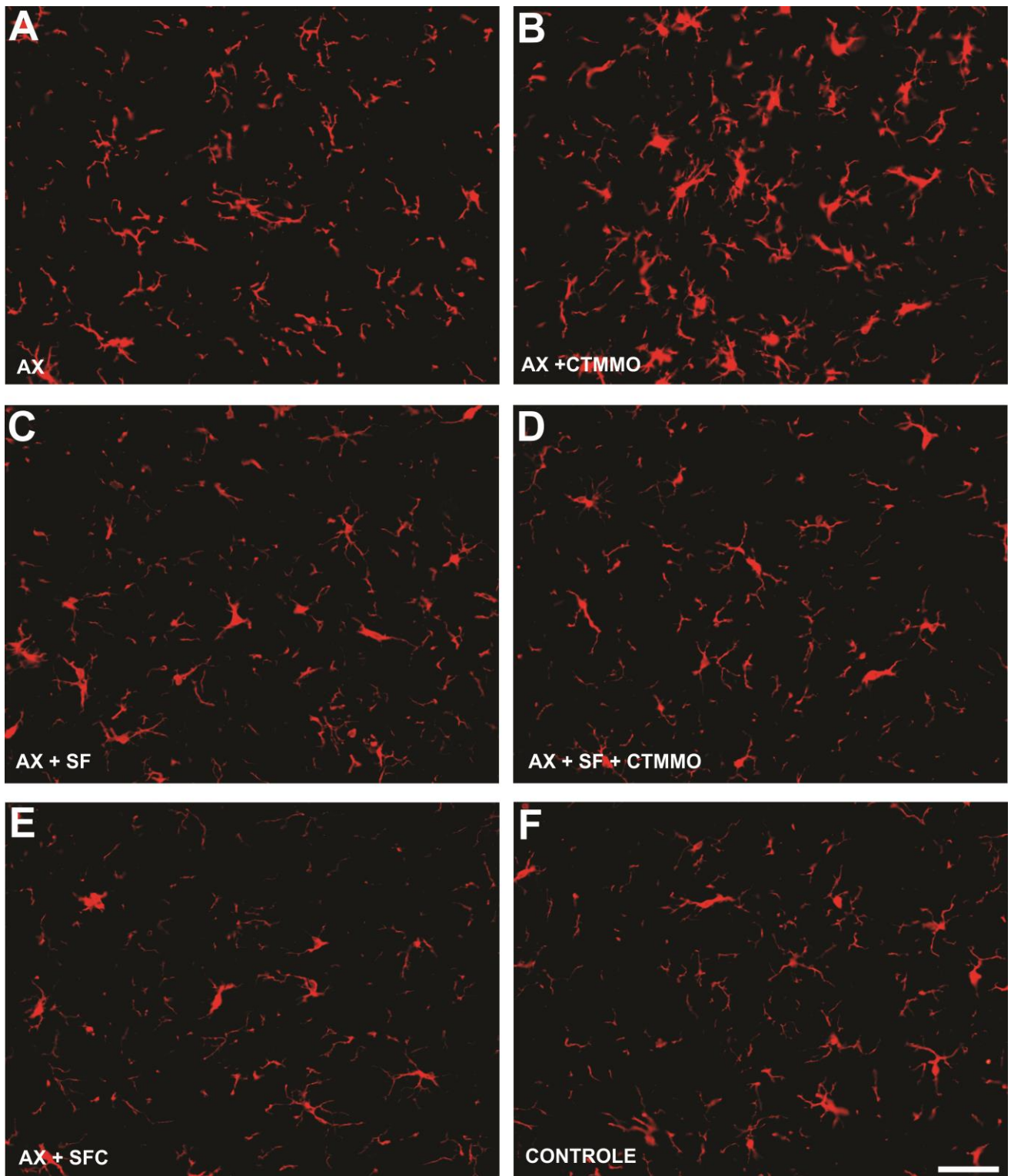




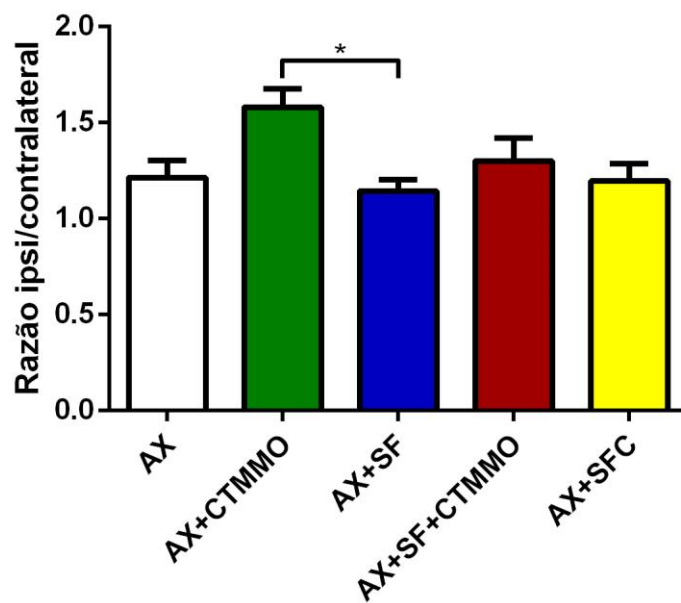
**Figura 32.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-Iba1, 4 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.



**Figura 33.** Representação gráfica da quantificação da reatividade microglial, 4 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).

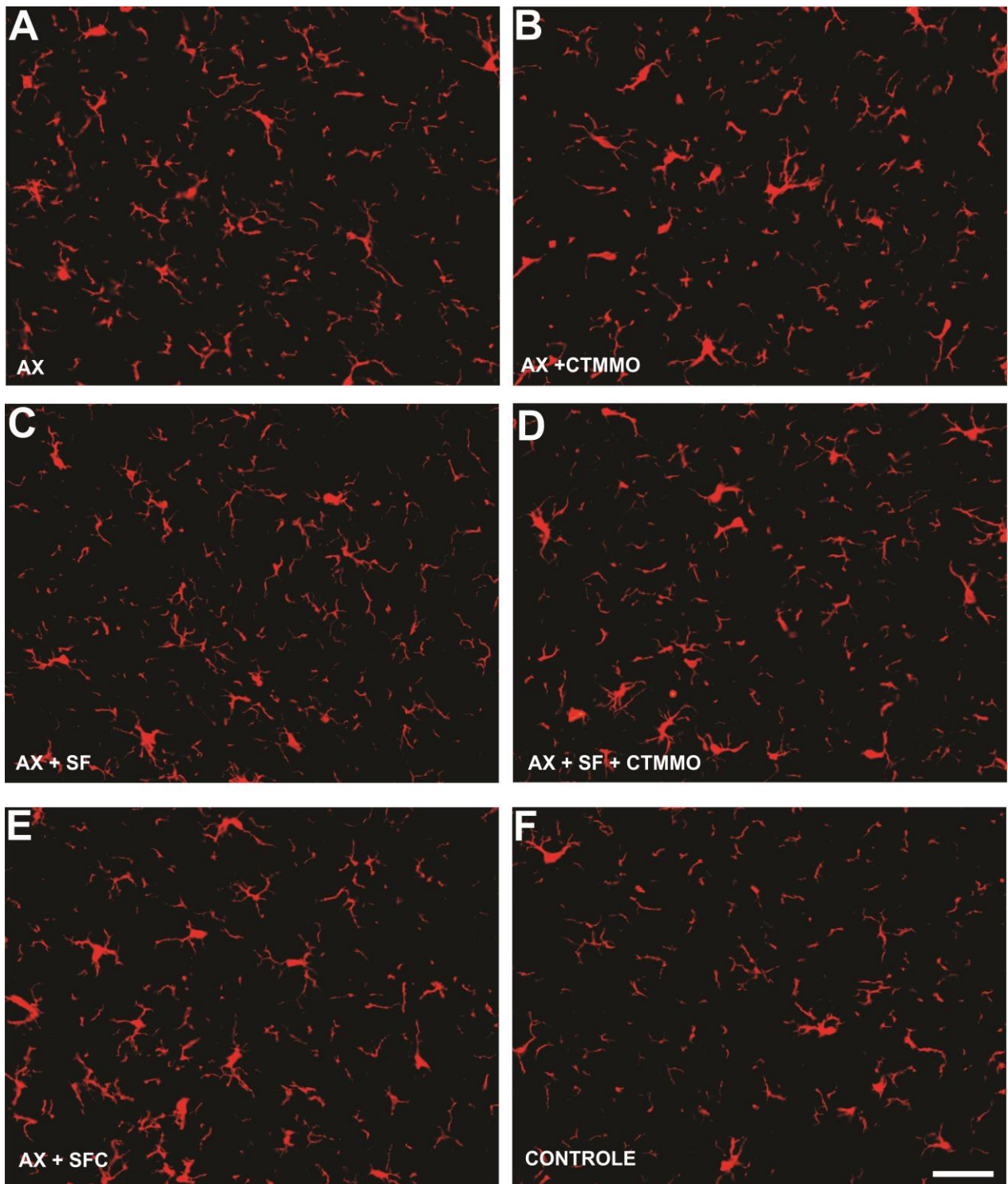


**Figura 34.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-Iba1, 8 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.



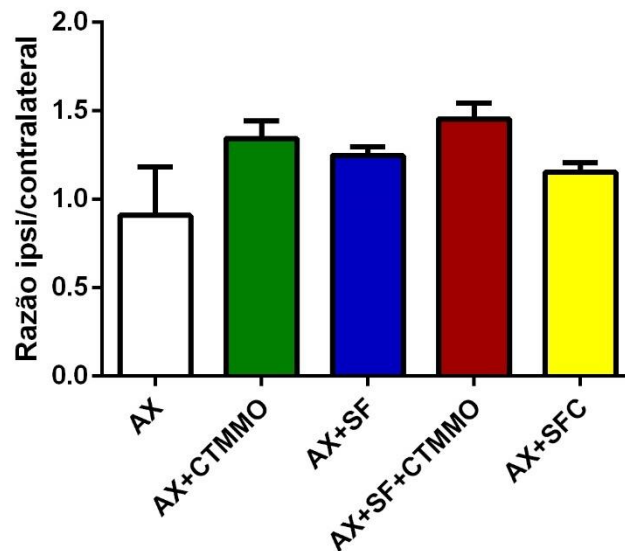
**Figura 35.** Representação gráfica da quantificação da reatividade microglial, 8 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\* $p < 0.05$ ).





**Figura 36.** Análise imunoistoquímica da coluna anterior da medula espinal marcada com anti-Iba1, 12 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – lado contralateral à lesão. Barra de escala= 50µm.





**Figura 37.** Representação gráfica da quantificação da reatividade microglial 12 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial.

## 5.5. Regeneração Nervosa

### 5.5.1. Área do nervo isquiático

Após o período de 4, 8 e 12 semanas pós axotomia, cortes transversais referentes aos grupos experimentais foram corados com *Sudan black* e analisados sob microscópio de luz.

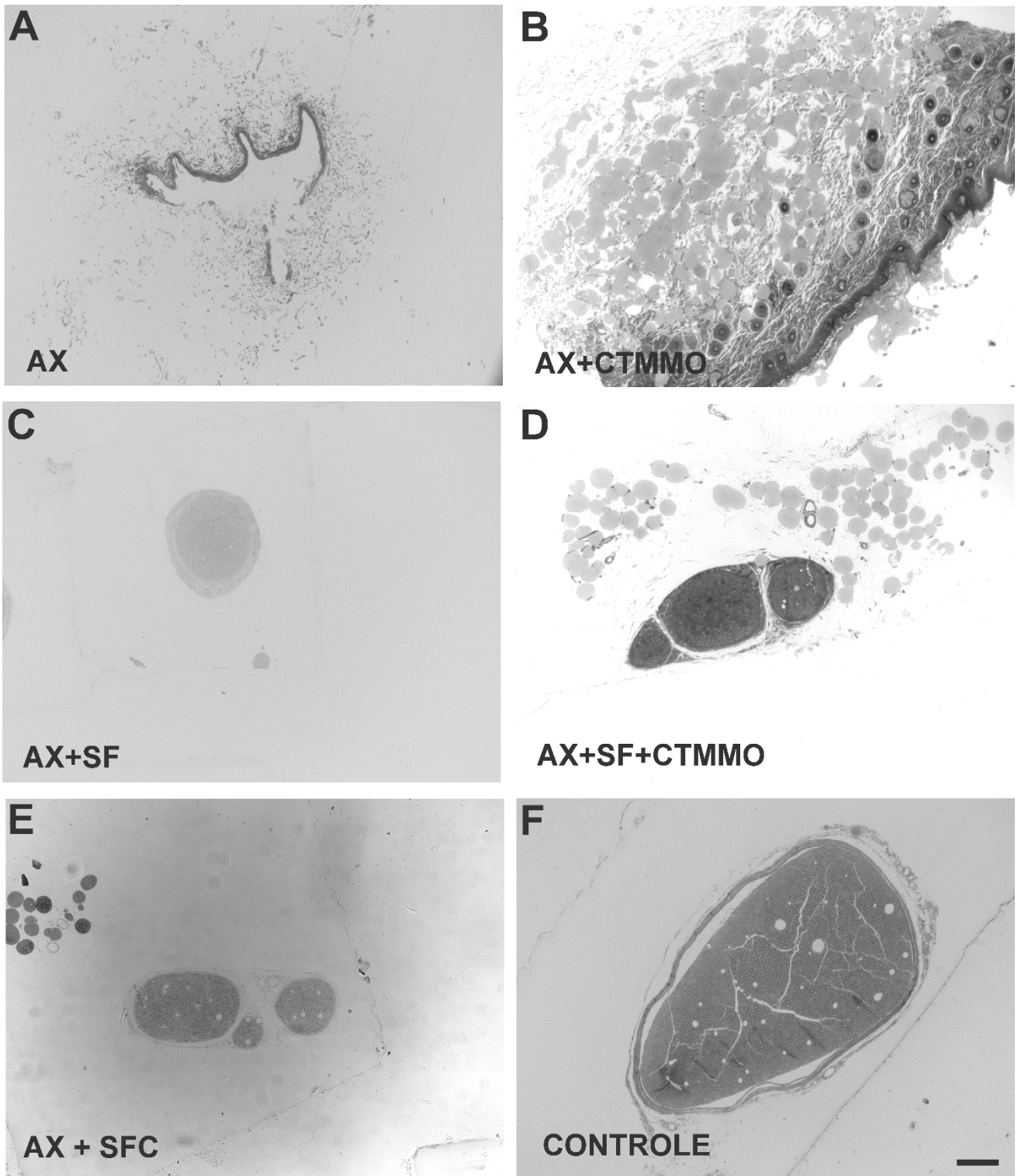
O nervo contralateral apresentou morfologia característica do nervo isquiático. Nos grupos axotomia (AX) e axotomia seguido de tratamento com células tronco (AX+CTMMO) não foi encontrado nervo, apenas tecido conjuntivo e adiposo nos três períodos de sobrevivência. Nos grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC observou-se epineuro delgado e, na maioria das amostras, morfologia cilíndrica característica e também formação de fasciculações entre os feixes de fibras nervosas. (Figuras 38, 40 e 42). Diferenças estatisticamente significantes foram detectadas quando comparadas as áreas dos nervos nos grupos em que foi realizado o reparo com selante de fibrina, com ou sem adição de células tronco com as dos nervos contralaterais. Por outro lado, os grupos que receberam o reparo, com ou sem tratamento de células tronco foram semelhantes entre si, não havendo diferença estatisticamente significativa. A média da área dos nervos estão

demonstradas na tabela 7 e nas figuras 39, 41 e 43 (valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão;  $p < 0,0001$ ).

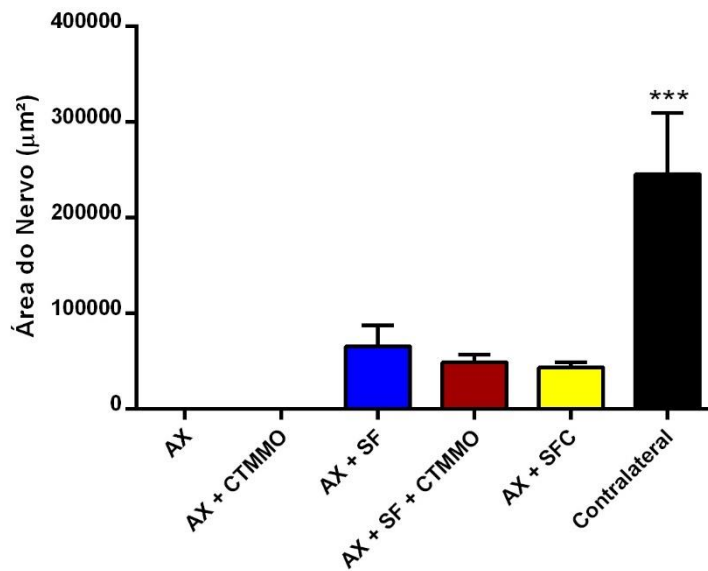
Ao se comparar a média da área dos nervos nos grupos 4, 8 e 12 semanas após a lesão, observou-se que não há diferença nos diferentes tempos de sobrevividas em um mesmo grupo, com exceção do Controle, que com quatro semanas apresenta menor área em relação a oito e doze semanas, que pode ser explicado devido ao crescimento do animal (Figura 44).

**Tabela 7.** Média da área dos nervos em todos os grupos e tempos analisados. Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão.

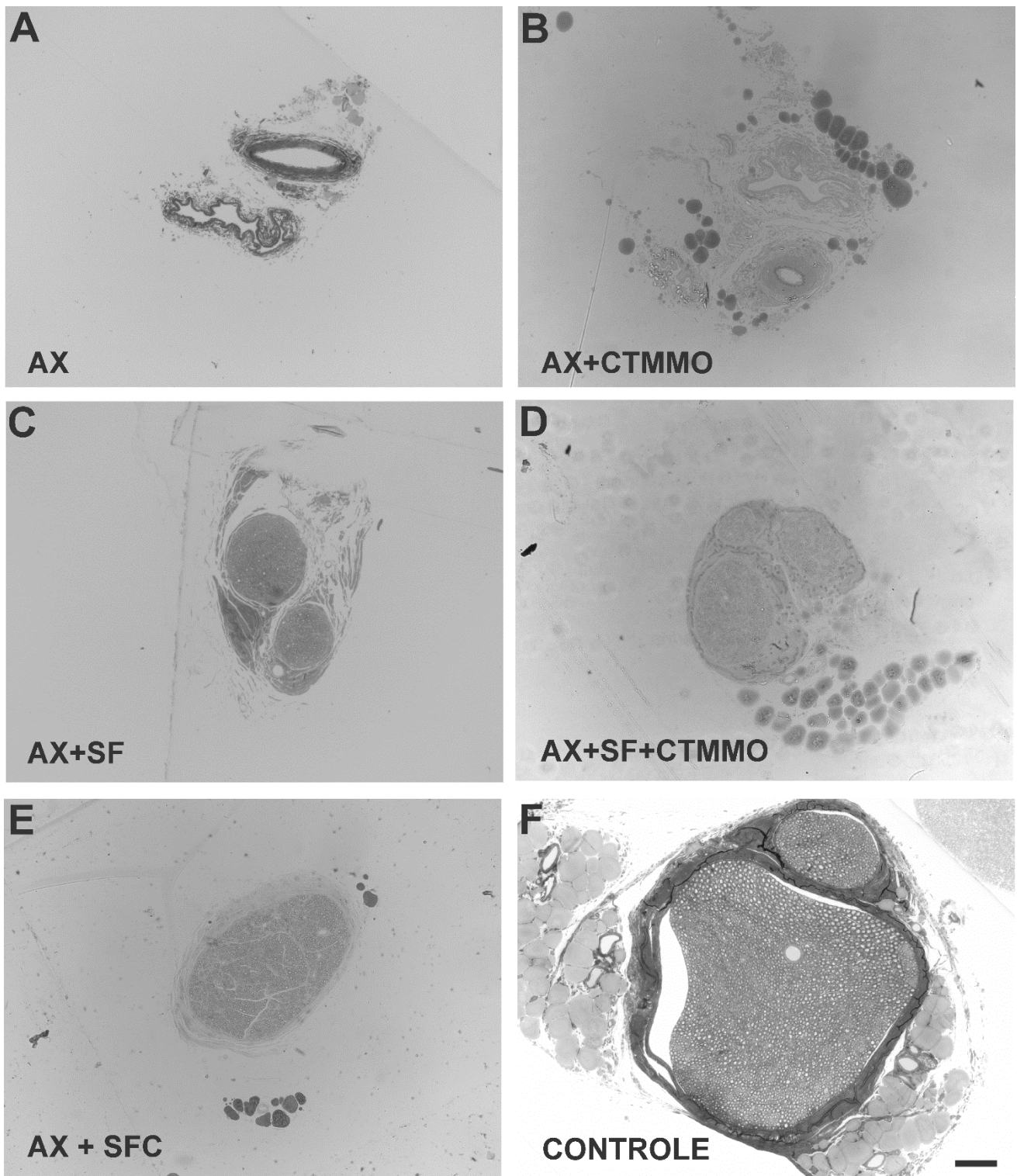
| Semanas pós lesão | Grupo I AX           | Grupo II AX+SF                    | Grupo III AX+SF+CTMM O             | Grupo IV AX+CTMM O   | Grupo V AX+SFC                    | Contralateral                      |
|-------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| <b>4S</b>         | 0,00 $\mu\text{m}^2$ | 65,27 $\pm$ 12,66 $\mu\text{m}^2$ | 48,86 $\pm$ 4,02 $\mu\text{m}^2$   | 0,00 $\mu\text{m}^2$ | 43,28 $\pm$ 3,07 $\mu\text{m}^2$  | 245,65 $\pm$ 20,12 $\mu\text{m}^2$ |
| <b>8S</b>         | 0,00 $\mu\text{m}^2$ | 68,79 $\pm$ 6,93 $\mu\text{m}^2$  | 76,82 $\pm$ 8,70 $\mu\text{m}^2$   | 0,00 $\mu\text{m}^2$ | 79,17 $\pm$ 6,95 $\mu\text{m}^2$  | 419,92 $\pm$ 54,99 $\mu\text{m}^2$ |
| <b>12S</b>        | 0,00 $\mu\text{m}^2$ | 69,52 $\pm$ 6,43 $\mu\text{m}^2$  | 102,34 $\pm$ 20,40 $\mu\text{m}^2$ | 0,00 $\mu\text{m}^2$ | 92,42 $\pm$ 13,06 $\mu\text{m}^2$ | 420,97 $\pm$ 20,77 $\mu\text{m}^2$ |



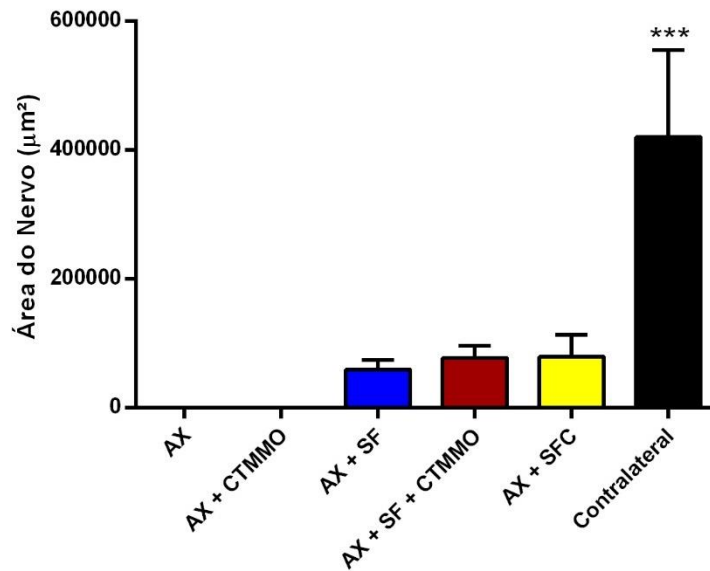
**Figura 38.** Análise da área dos nervos, 4 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – nervo contralateral, não lesionado. Barra de escala= 100µm.



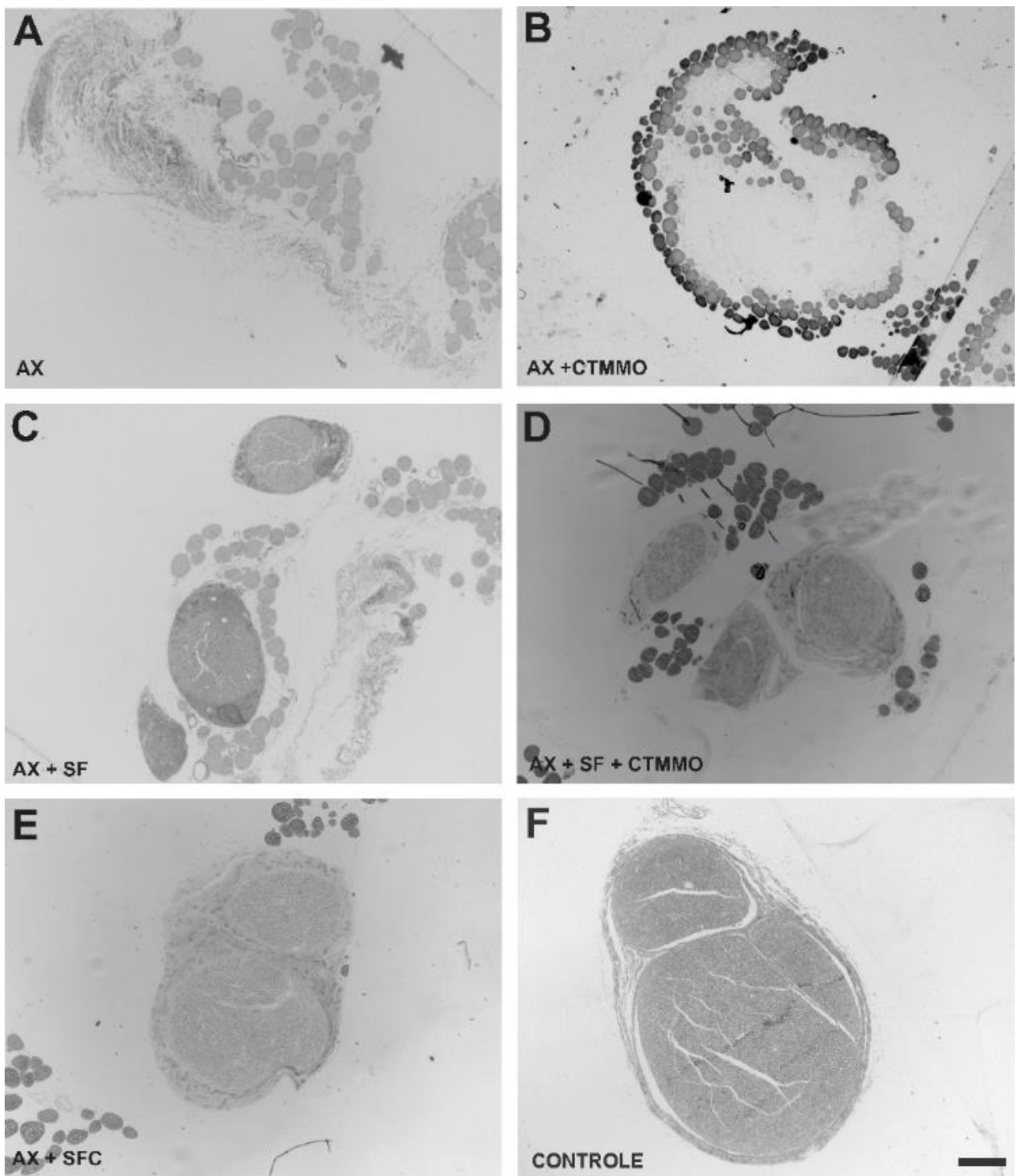
**Figura 39.** Representação gráfica da área do nervo isquiático, 4 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Contralateral – nervo não lesionado (\*\*p <0.001).



**Figura 40.** Análise da área do nervo isquiático, 8 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 100µm.

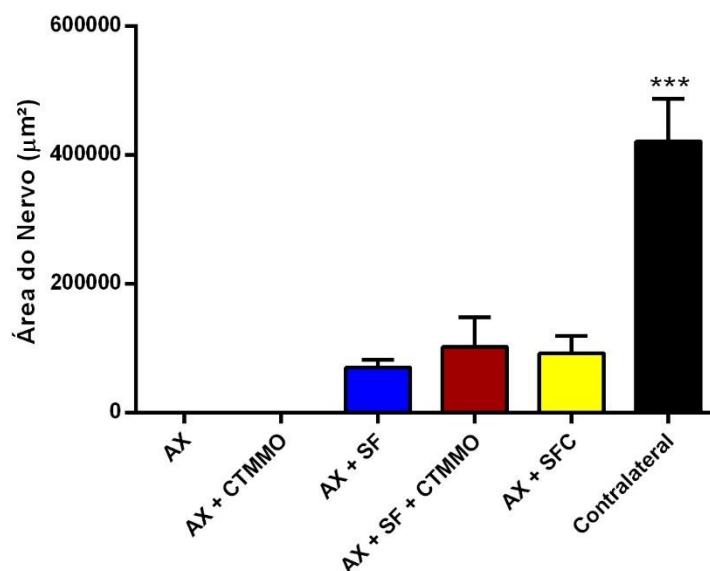


**Figura 41.** Representação gráfica da área do nervo isquiático, 8 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Contralateral – nervo não lesionado (\*\*\*) $p < 0.001$ ).

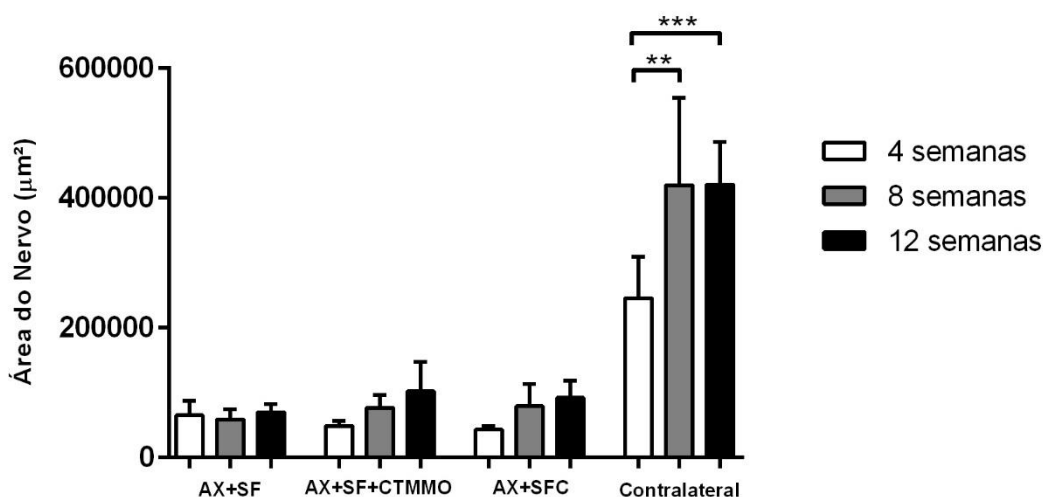


**Figura 42.** Análise da área do nervo isquiático, 12 semanas após a lesão. **A.** AX- axotomia; **B.** AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; **C.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **D.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **E.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **F.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 100µm.





**Figura 43.** Representação gráfica da área do nervo isquiático, 12 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Contralateral – nervo não lesionado (\* $p < 0.001$ ).



**Figura 44.** Representação gráfica da área do nervo isquiático 4, 8 e 12 semanas após a axotomia do nervo isquiático. AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Contralateral- Controle sem lesão (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 5.5.2. Contagem de axônios mielinizados

Imagens de microscopia de luz de cortes transversais de nervos isquiáticos corados com *Suddan black*, dos diferentes grupos experimentais, 4, 8 e 12 semanas após a lesão, estão representadas nas figuras 45, 47 e 49 respectivamente. A quantificação do número de axônios mielínicos está representada pelos gráficos (Figuras 46, 48 e 50).

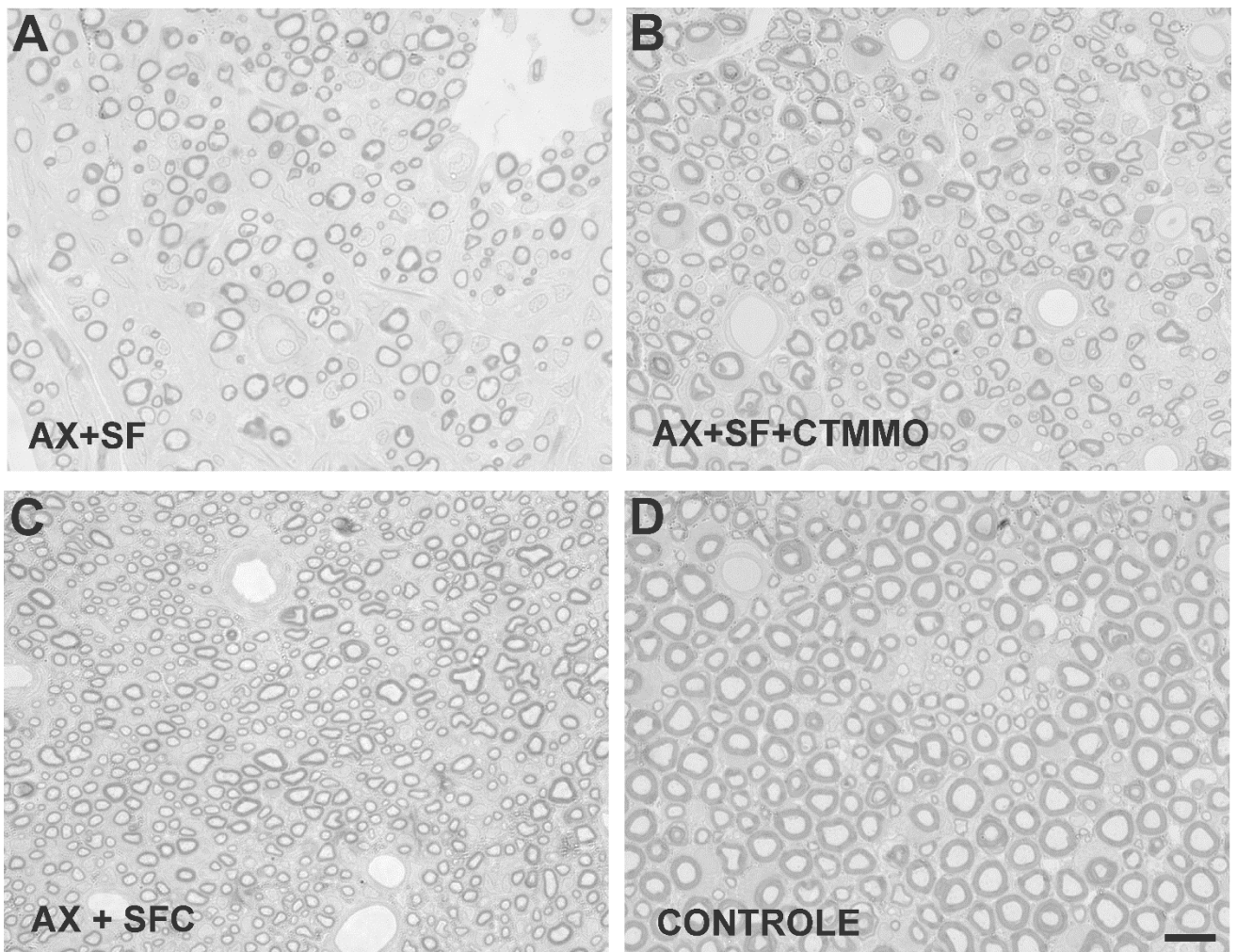
Observou-se que o número de axônios mielínicos foi significativamente menor nos grupos onde houve a lesão, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, nos grupos em que houve reparo com selante de fibrina ou selante de fibrina comercial com ou sem tratamento de células tronco, o resultado foi significativamente melhor do que os grupos que não receberam o reparo (AX e AX+CTMMO) (Tabela 8). Estes não apresentaram nenhum axônio, visualizando-se apenas tecido conjuntivo e adiposo. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Ao se comparar a média da contagem dos axônios em um mesmo grupo, 4, 8 e 12 semanas após a lesão, observou-se que não há diferença nos diferentes tempos de sobrevivência.

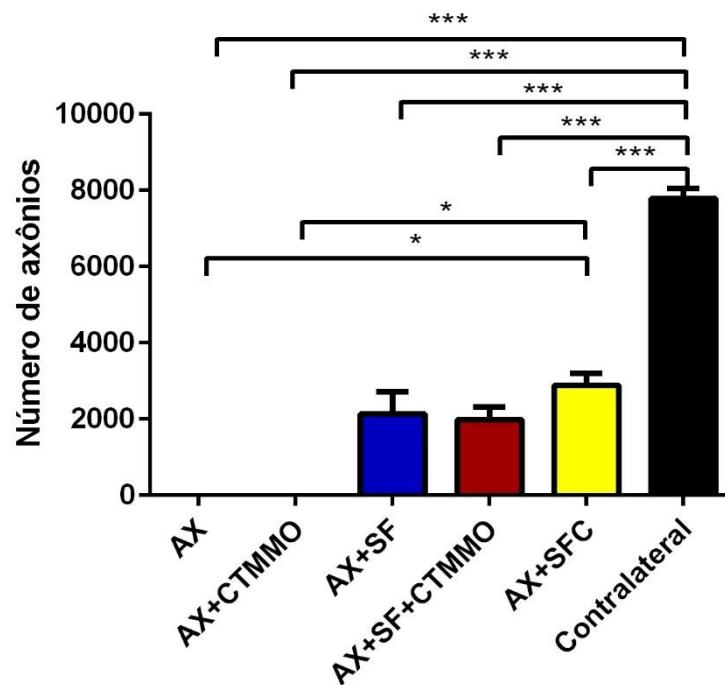
**Tabela 8.** Média do número de axônios regenerados em todos os grupos e tempos analisados.

Valores médios por grupo  $\pm$  erro padrão.

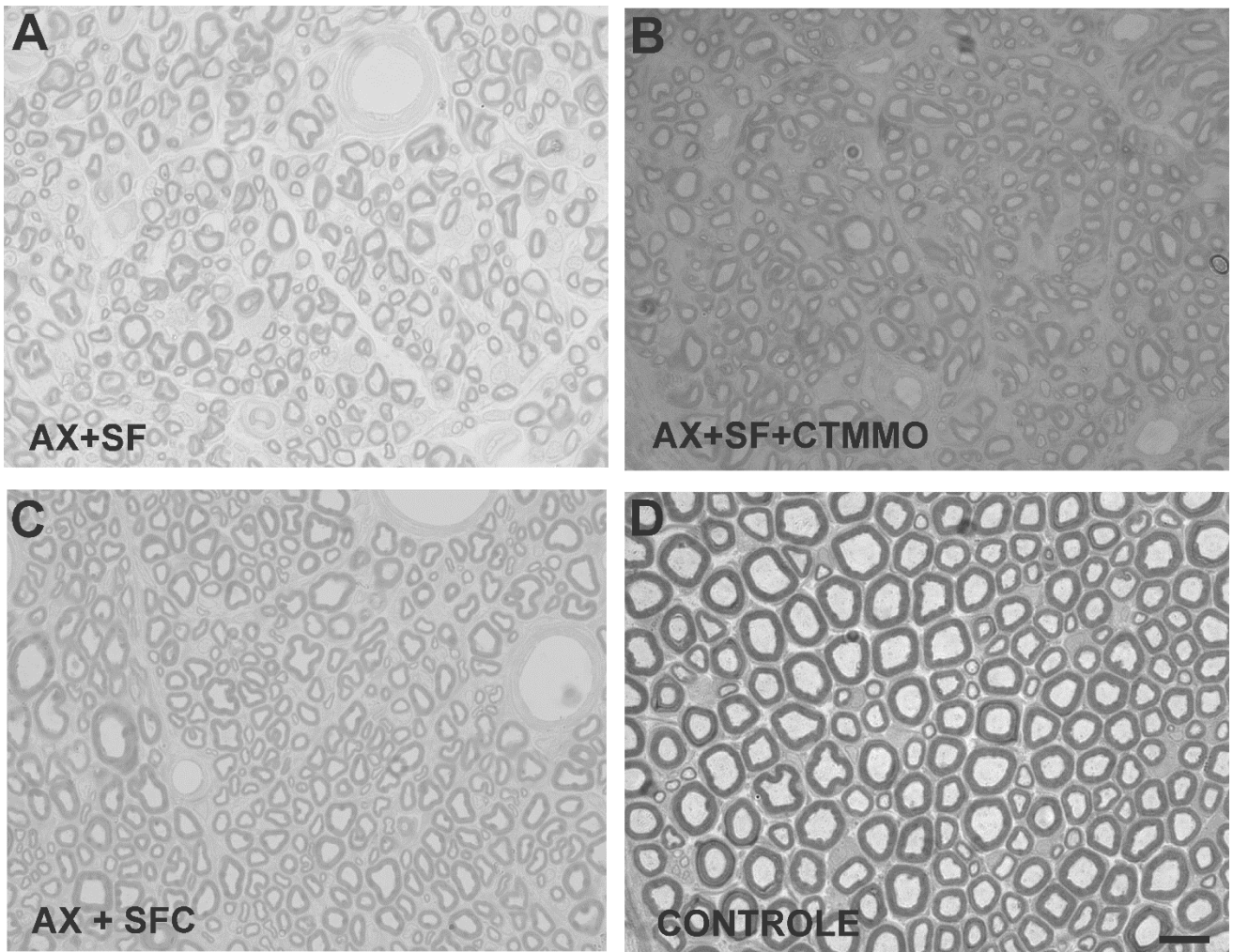
| Semanas pós lesão | Grupo I | Grupo II<br>AX+SF | Grupo III<br>AX+SF+CTMMO | Grupo IV | Grupo V<br>AX+SFC | Contralateral     |
|-------------------|---------|-------------------|--------------------------|----------|-------------------|-------------------|
| 4S                | 0.00    | 2.129 $\pm$ 579,2 | 1.982 $\pm$ 327,7        | 0.00     | 2.881 $\pm$ 303,5 | 6.776 $\pm$ 182,6 |
| 8S                | 0.00    | 1.999 $\pm$ 235,6 | 2.302 $\pm$ 379,0        | 0.00     | 2.508 $\pm$ 590,4 | 8.131 $\pm$ 437,4 |
| 12S               | 0.00    | 2.119 $\pm$ 283,8 | 2.730 $\pm$ 463,4        | 0.00     | 3.156 $\pm$ 509,9 | 8.458 $\pm$ 386,3 |



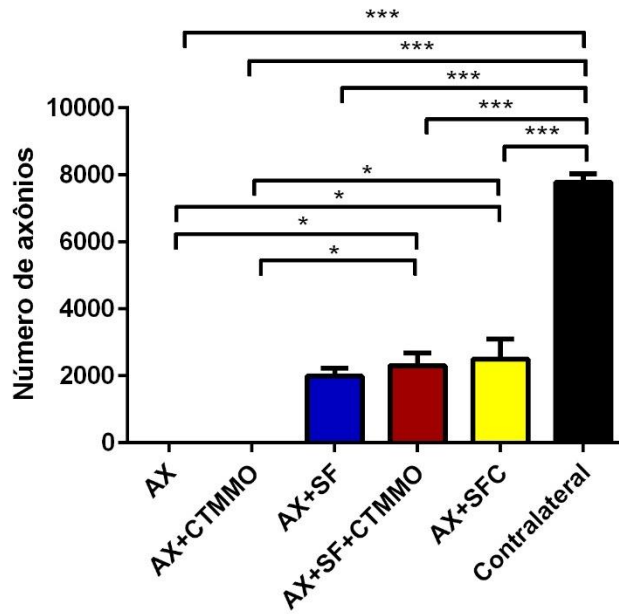
**Figura 45.** Análise da contagem de axônios mielinizados, 4 semanas após a lesão. **A.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **B.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **C.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **D.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 10 $\mu$ m.



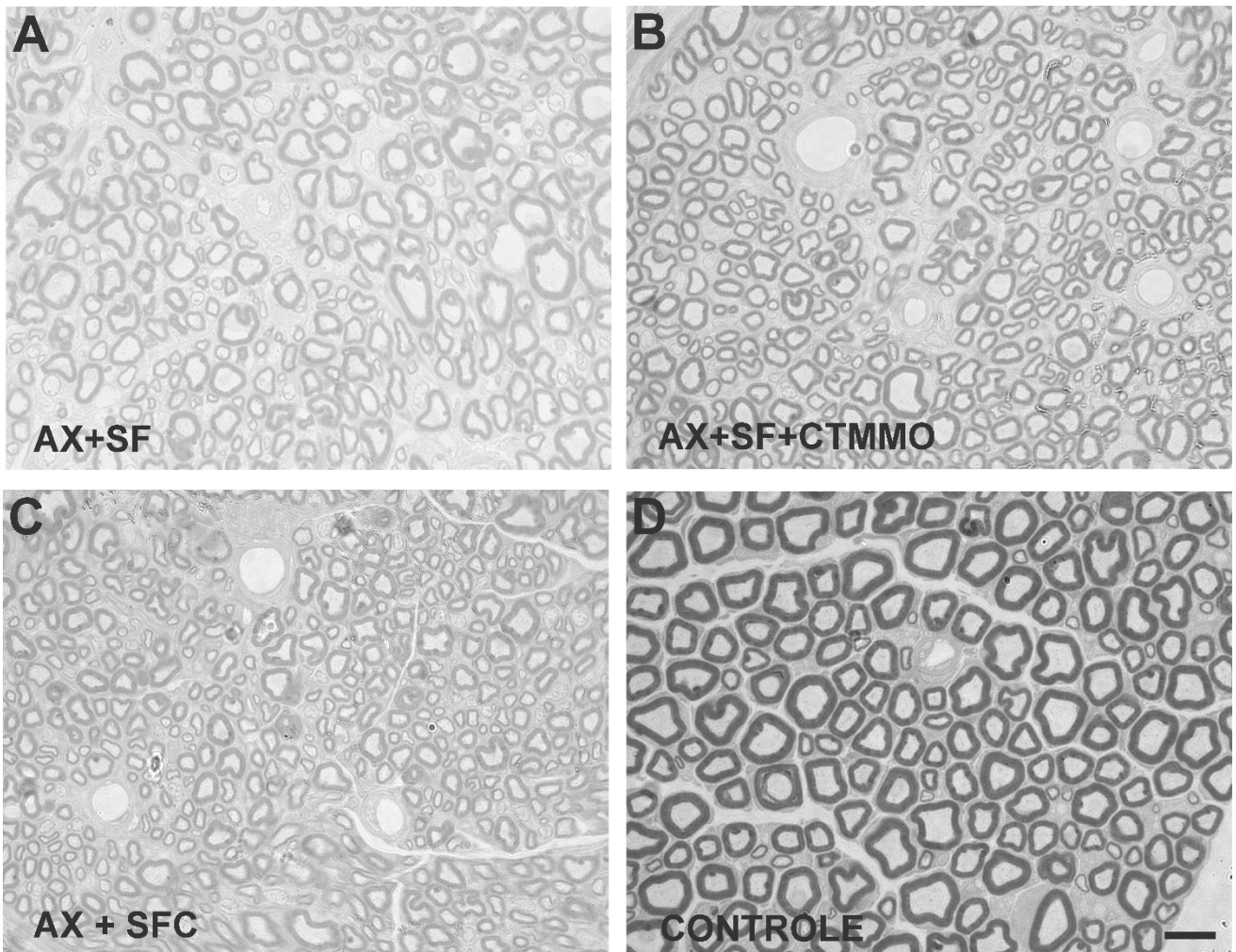
**Figura 46.** Representação gráfica da contagem dos axônios, 4 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Contralateral – nervo não lesionado (\*p <0.05, \*\*\*p <0.001).



**Figura 47.** Análise da contagem de axônios mielinizados, 8 semanas após a lesão. **A.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **B.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **C.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **D.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 10 $\mu$ m.

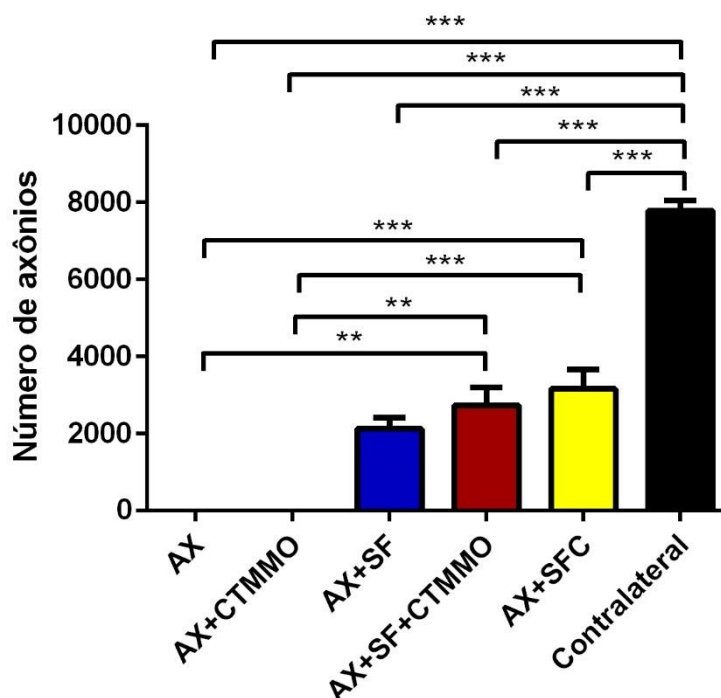


**Figura 48.** Representação gráfica da contagem dos axônios, 8 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Contralateral – nervo não lesionado (\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001).



**Figura 49.** Análise da contagem de axônios mielinizados, 12 semanas após a lesão. **A.** AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; **B.** AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; **C.** AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; **D.** Controle – nervo contralateral não lesionado. Barra de escala= 10 $\mu$ m.

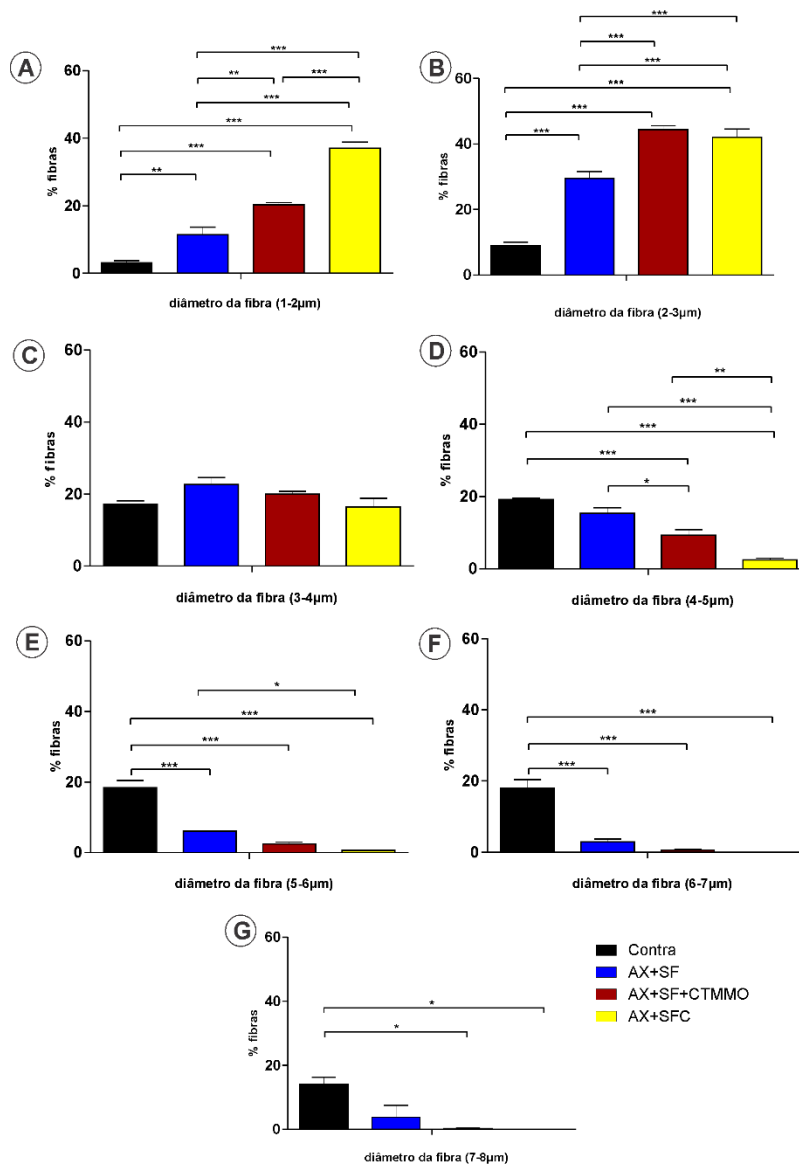




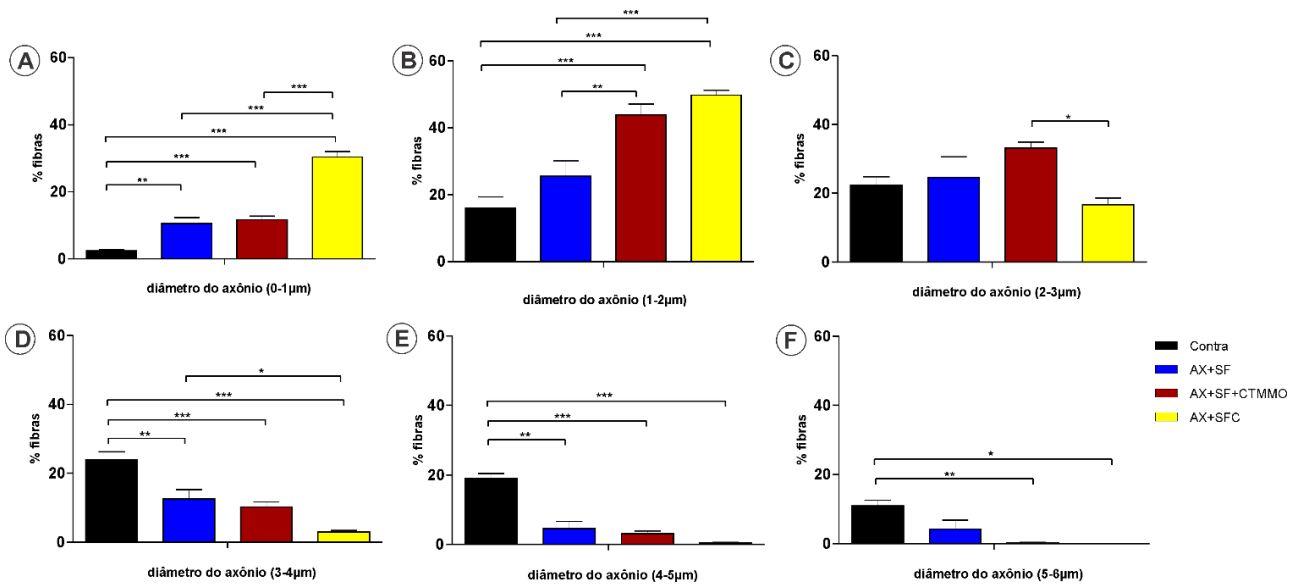
**Figura 50.** Representação gráfica da contagem dos axônios, 12 semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Contralateral – nervo não lesionado (\*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).

### 5.6. Avaliação Morfométrica do Nervo Isquiático

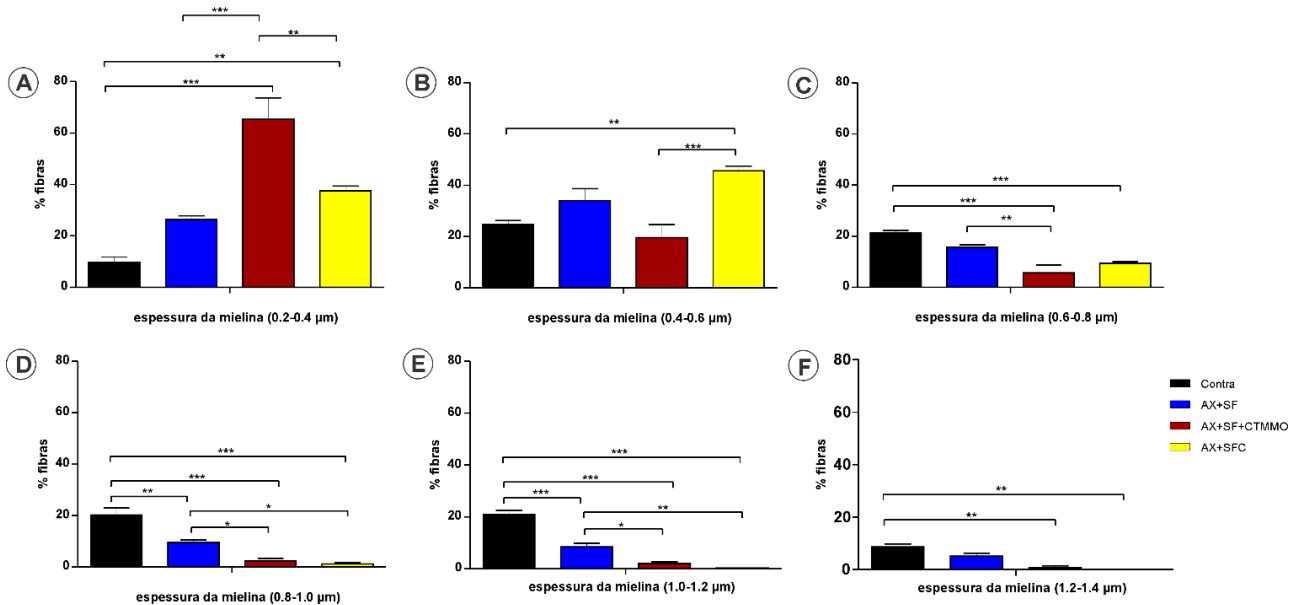
Dados morfométricos demonstraram fibras estatisticamente menores em relação ao calibre (Figura 51) diâmetro do axônio (Figura 52) e espessura da bainha de mielina (Figura 53), no grupo em que foi realizado o reparo com selante de fibrina comercial (AX+SFC) e no grupo em que foi utilizado o selante de fibrina do CEVAP com adição de células tronco (AX+SF+CTMMO), após 4 semanas, em comparação aos grupos em que foi realizado o reparo com selante de fibrina derivado da peçonha de serpente (AX+SF) e o lado contralateral. Entretanto, com 8 e 12 semanas, as respostas foram similares entre todos os grupos. Não foram observadas diferenças significativas em relação a razão “g”.



**Figura 51.** Representação gráfica do diâmetro da fibra, 4 semanas após a lesão. **(A-G)** dados estatisticamente significantes entre os grupos nos diâmetros entre 1 a 8 µm. Contra- nervo não lesionado; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).



**Figura 52.** Representação gráfica do diâmetro do axônio, 4 semanas após a lesão. **(A-F)** dados estatisticamente significantes entre os grupos nos diâmetros entre 1 a 6 µm. Contra- nervo não lesionado; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).



**Figura 53.** Representação gráfica da espessura da bainha de mielina, 4 semanas após a lesão. **(A-F)** dados estatisticamente significantes entre os grupos nas espessuras de 0,2 a 1,4 µm. Contra- nervo não lesionado; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; (\*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).

### **5.6.1. Diâmetro das Fibras Mielínicas (DF)**

A distribuição de frequência do diâmetro da fibra mielínica nos grupos AX+SF e contralateral variou entre 1 a 14  $\mu\text{m}$  ao longo das semanas, com ampla distribuição de frequência desde 4 semanas de análise (1 a 11  $\mu\text{m}$  e 2 -11  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Os grupos AX+SF+CTMMO e AX+SFC mostraram fibras de menor calibre 4 semanas pós lesão, variando de 1 a 6  $\mu\text{m}$  e 1 a 8  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Entretanto, com 8 e 12 semanas, a distribuição foi similar aos outros grupos (Figura 54).

### **5.6.2. Diâmetro dos Axônios Mielínicos (DAM)**

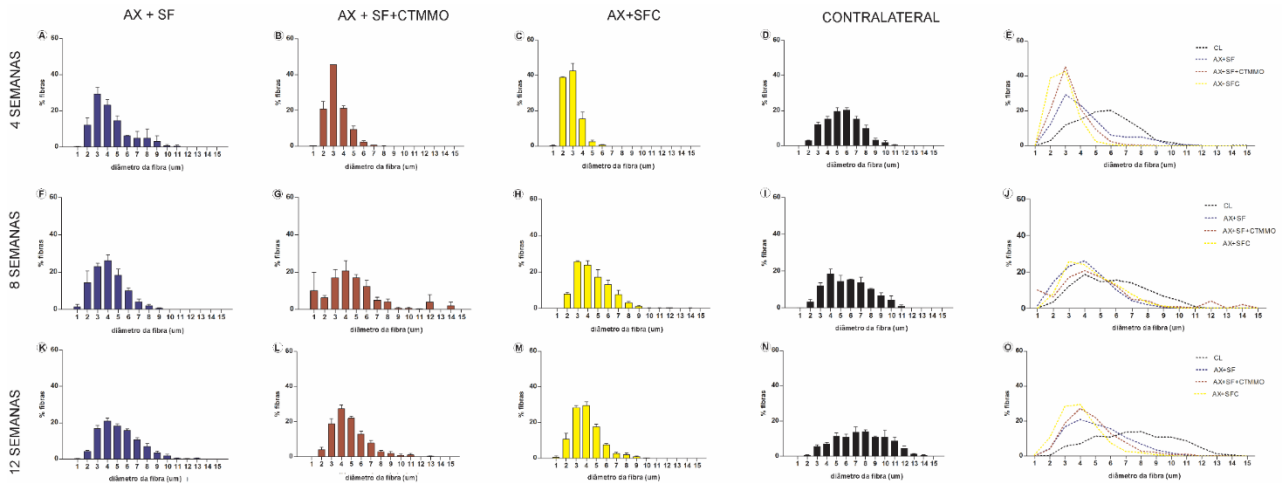
O nervo contralateral mostrou axônios com diâmetro variando entre 1 e 12  $\mu\text{m}$ . No nervo lesionado do grupo em que foi realizado o reparo com selante de fibrina do CEVAP (AX+SF) a variação do diâmetro foi similar (entre 1 e 9  $\mu\text{m}$ ), enquanto que os grupos AX+SF+CTMMO e AX+SFC apresentaram diâmetros menores (entre 1 e 7  $\mu\text{m}$ ), quatro semanas pós lesão. Entretanto, respostas similares foram observadas entre todos os grupos 8 e 12 semanas pós lesão (Figura 55).

### **5.6.3. Espessura da Bainha de Mielina (EBM)**

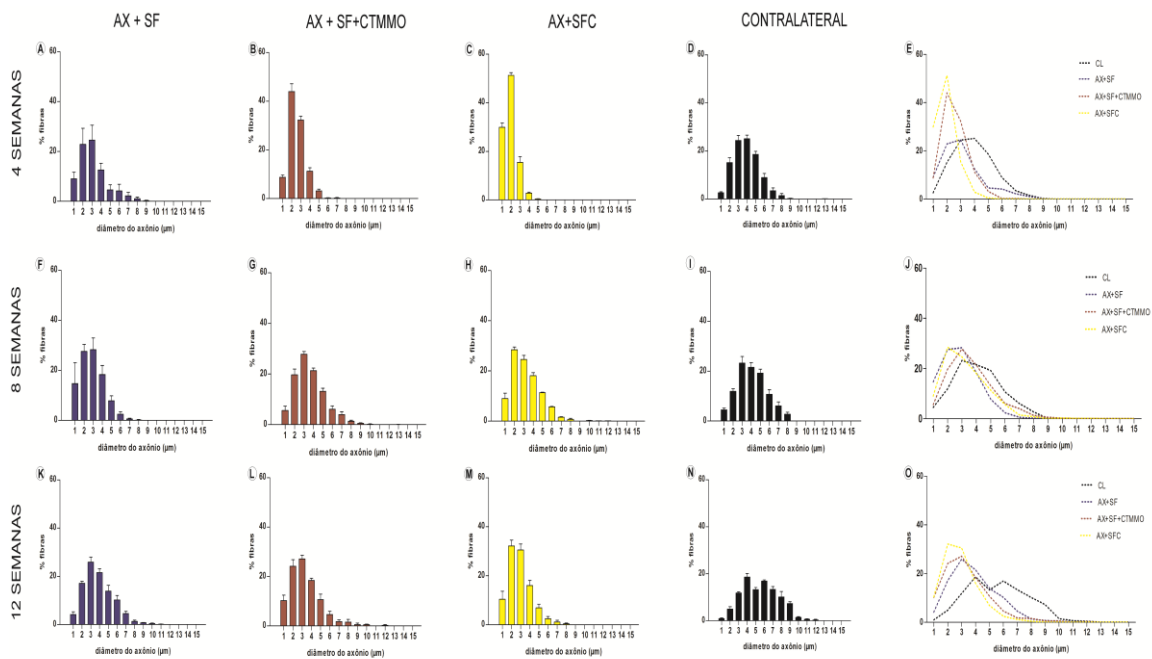
Os nervos dos grupos AX+SF e contralateral apresentaram espessura da bainha de mielina variando entre 0,2 a 3,2  $\mu\text{m}$  ao longo das semanas, enquanto os grupos AX+SFC e AX+SF+CTMMO apresentaram espessura variando de 0,2 a 2,4  $\mu\text{m}$  (Figura 56).

### **5.6.4. Razão “g” (RZG)**

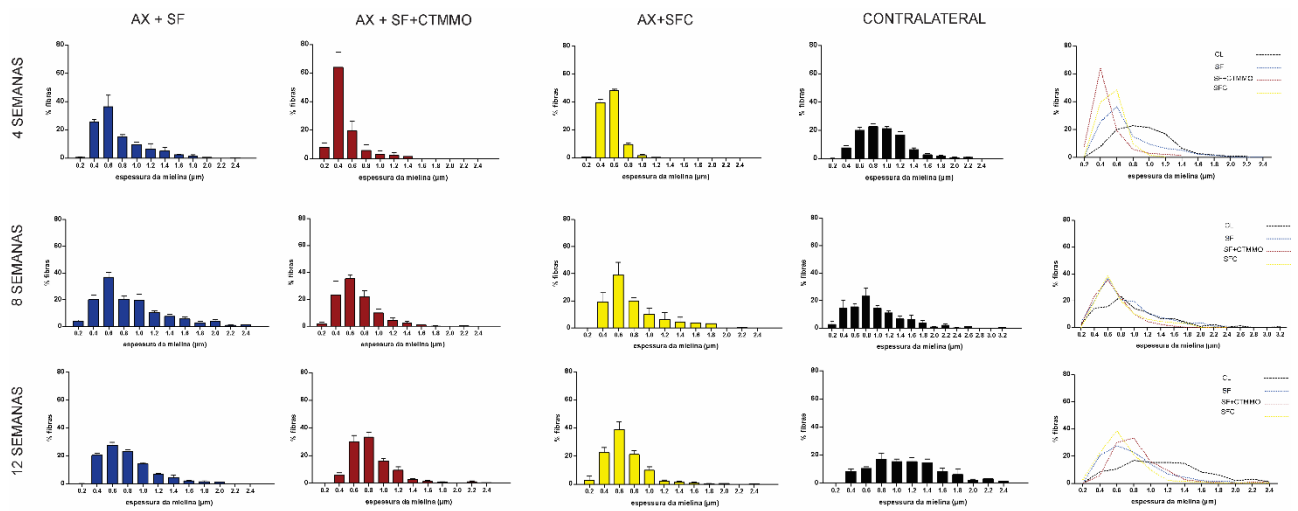
Já a correlação entre o diâmetro do axônio e a razão “g” (razão entre o diâmetro axonal e o diâmetro da fibra) indicou que todos os grupos estão próximos a um índice positivo de mielinização, que resultou em grande número de axônios grandes e perto da razão g considerada normal (Figura 57).



**Figura 54.** Distribuição de frequência do diâmetro das fibras nervosas em todos os grupos analisados 4, 8 e 12 semanas pós lesão. **(A, B, C)** Lado ipsilateral, 4 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(D)** Lado contralateral, 4 semanas após a lesão. **(E)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro das fibras, 4 semanas após a lesão. **(F, G, H)** Lado ipsilateral, 8 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(I)** Lado contralateral, 8 semanas após a lesão. **(J)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro das fibras, 8 semanas após a lesão. **(K, L, M)** Lado ipsilateral, 12 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(N)** Lado contralateral, 12 semanas após a lesão. **(O)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro das fibras, 12 semanas após a lesão.

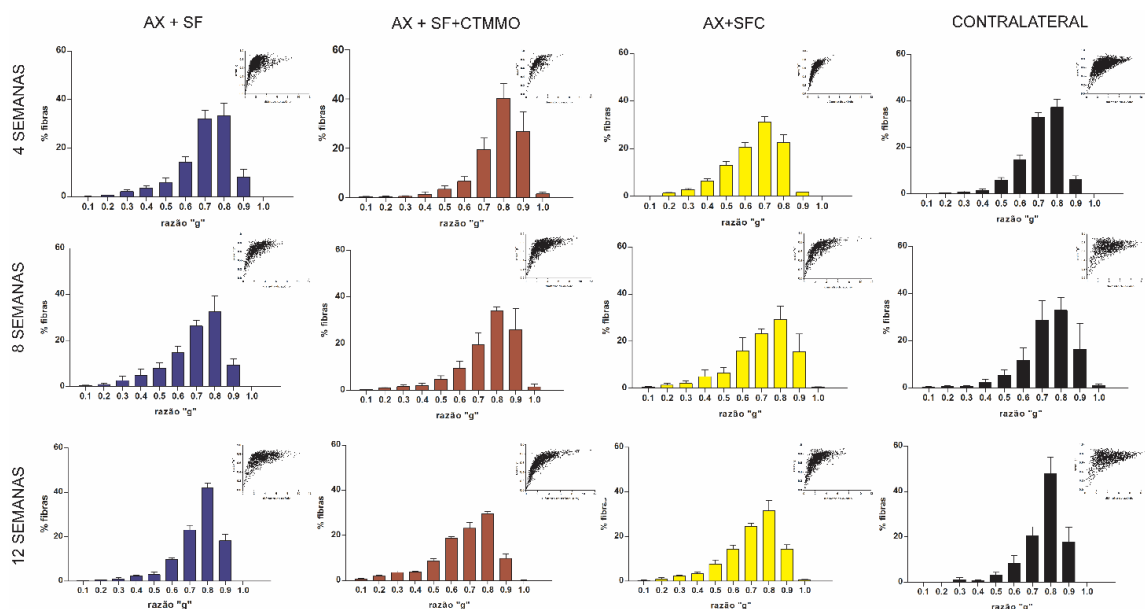


**Figura 55.** Distribuição de frequência do diâmetro dos axônios em todos os grupos analisados 4, 8 e 12 semanas pós lesão. **(A, B, C)** Lado ipsilateral, 4 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(D)** Lado contralateral, 4 semanas após a lesão. **(E)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro dos axônios, 4 semanas após a lesão. **(F, G, H)** Lado ipsilateral, 8 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(I)** Lado contralateral, 8 semanas após a lesão. **(J)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro dos axônios, 8 semanas após a lesão. **(K, L, M)** Lado ipsilateral, 12 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(N)** Lado contralateral, 12 semanas após a lesão. **(O)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências do diâmetro dos axônios, 12 semanas após a lesão.



**Figura 56.** Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina em todos os grupos analisados 4, 8 e 12 semanas pós lesão. **(A, B, C)** Lado ipsilateral, 4 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(D)** Lado contralateral, 4 semanas após a lesão. **(E)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da espessura da bainha de mielina, 4 semanas após a lesão. **(F, G, H)** Lado ipsilateral, 8 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(I)** Lado contralateral, 8 semanas após a lesão. **(J)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da espessura da bainha de mielina, 8 semanas após a lesão. **(K, L, M)** Lado ipsilateral, 12 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(N)** Lado contralateral, 12 semanas após a lesão. **(O)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da espessura da bainha de mielina, 12 semanas após a lesão.





**Figura 57.** Distribuição de frequência da razão “g” e *dotplot* entre a razão “g”/diâmetro do axônio, em todos os grupos analisados 4, 8 e 12 semanas pós lesão. **(A, B, C)** Lado ipsilateral, 4 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(D)** Lado contralateral, 4 semanas após a lesão. **(E)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da razão “g”, 4 semanas após a lesão. **(F, G, H)** Lado ipsilateral, 8 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(I)** Lado contralateral, 8 semanas após a lesão. **(J)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da razão “g”, 8 semanas após a lesão. **(K, L, M)** Lado ipsilateral, 12 semanas após a lesão – grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC, respectivamente. **(N)** Lado contralateral, 12 semanas após a lesão. **(O)** Gráfico de sobreposição de curvas das frequências da razão “g”, 12 semanas após a lesão.

## 5.7. Análise ultraestrutural da medula espinal

Optamos em fazer a morfometria da medula entre os grupos AX, AX+SF e AX+SFC com 4 semanas pós lesão, pois neste tempo observamos mais diferenças entre os parâmetros observados. Como o selante de fibrina derivado da peçonha de serpente (AX+SF) não teve diferença significativa em relação ao grupo em que foi adicionado células tronco (AX+SF+CTMMO), optamos em analisar se havia diferenças entre os grupos em que foi realizado o reparo com selante de fibrina do CEVAP e o selante de fibrina comercialmente disponível.

As fotomicrografias referentes a cada motoneurônio estudado foram montadas

seqüencialmente em aumento de 11.000X. Apenas motoneurônios identificados como alfa, pela presença de pelo menos um terminal pré-sináptico colinérgico (tipo C) em aposição à superfície da membrana neuronal, foram considerados para o estudo.

A análise das medulas do lado contralateral revelou ampla cobertura sináptica da membrana neuronal (Figura 58A). No grupo em que não foi realizado o reparo, foram observadas alterações estruturais ao redor dos motoneurônios alfa medulares, onde os inputs mostraram-se parcialmente ou totalmente retraídos e, foram identificadas projeções gliais em contato com a membrana pós-sináptica, preenchendo o espaço entre terminais sinápticos e a membrana pós-sináptica. Essas estruturas foram identificadas como astrócitos devido a sua baixa eletrondensidade (Figura 58B). Entretanto, os grupos em que foi realizado o reparo (AX+SF e AX+SFC), apresentaram padrão da cobertura sináptica mais próximas ao normal (Figura 58C e 58D).

A cobertura sináptica total, que representa a superfície do motoneurônio que está em contato com os terminais pré-sinápticos, revelaram uma diminuição dos terminais excitatórios (tipo S) em todos os grupos analisados, quando comparados ao lado contralateral. Foram observados 41,22% menos cobertura deste terminal no grupo em que não foi realizado o reparo (AX) quando comparado com o lado contralateral. Resultados similares foram observados no grupo em que foi realizado o reparo com selante de fibrina comercial (AX+SFC), com 29,13% de perda. Em contrapartida, no grupo em que foi realizado o reparo com o selante derivado da peçonha de serpente (AX+SF) mostrou 23,78% menos cobertura e não foi identificada diferença significativa em relação ao lado contralateral. Entretanto, ambos os grupos em que foi realizado o reparo (AX+SF e AX+SFC) não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 59).

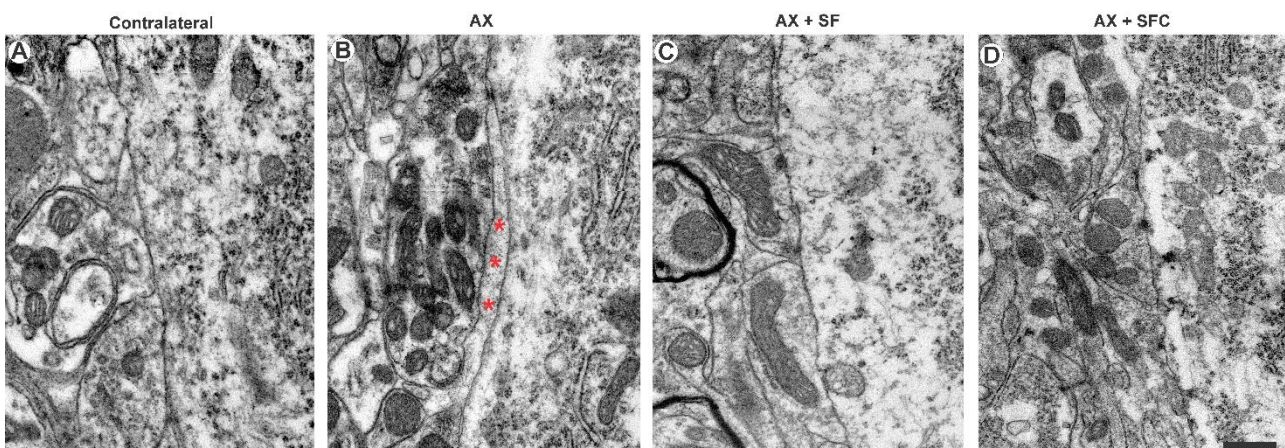
Já os inputs inibitórios (tipo F), apresentaram 30,07%, 7,11% e 11,68% menos cobertura nos grupos AX, AX+SF e AX+SFC, respectivamente, comparados ao grupo contralateral, sendo apenas o grupo AX diferente estatisticamente dos outros grupos. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos terminais do tipo C, colinérgicos (Figura 59).

Além disso, a análise quantitativa do número de terminais sinápticos em aposição com a superfície do motoneurônio, normalizada por 100 $\mu$ m de membrana, apresentou uma diminuição no

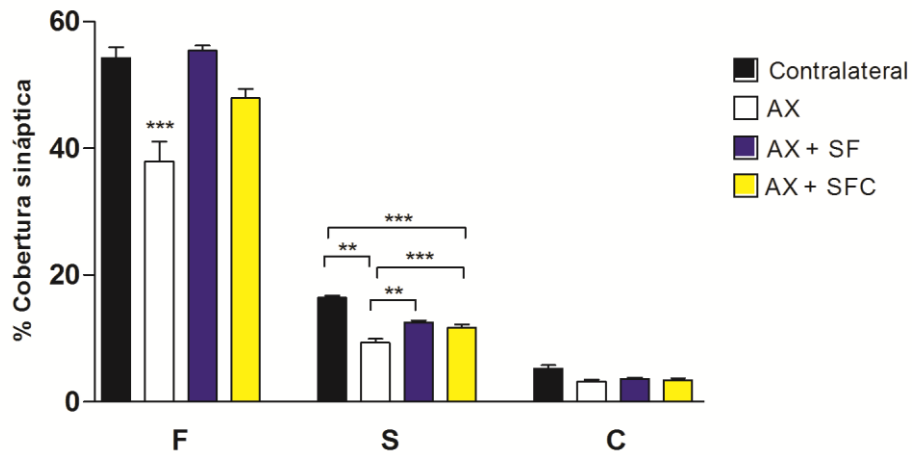
número de botões sinápticos no grupo em que foi realizada apenas a axotomia (AX) para os terminais dos tipos S e F. O grupo em que foi realizado o reparo com selante comercial apresentou diferença significativa na redução de terminais S, excitatórios, mas não foi diferente do grupo em que foi realizada a axotomia com selante de fibrina do CEVAP (Figura 60).

Não foram observadas diferenças significativas em relação ao tamanho dos terminais sinápticos (Figura 61).

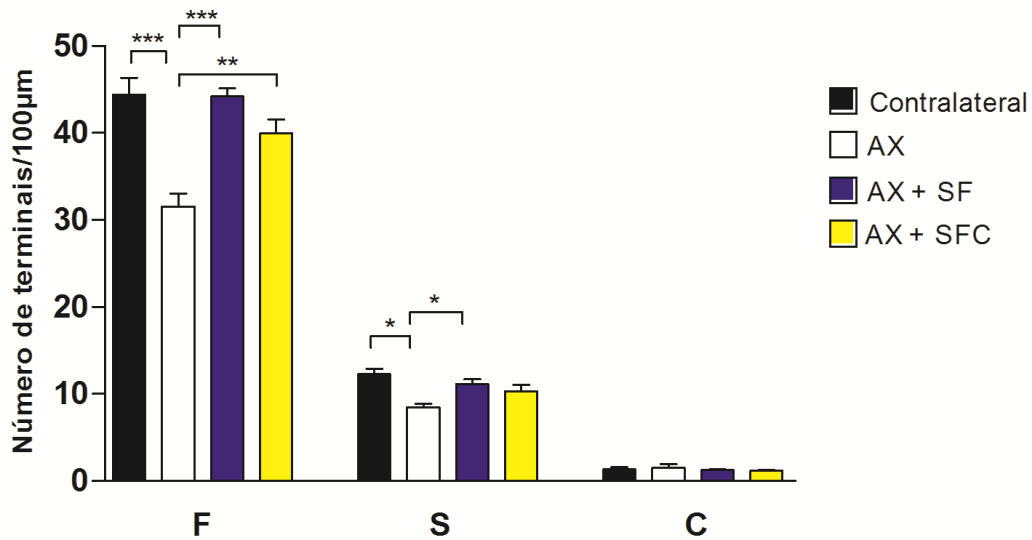
Os espaços entre os terminais que se mantiveram em aposição à membrana pré-sináptica foram medidos. Calculou-se a distribuição de frequência em intervalos de 0,1  $\mu\text{m}$ . Esses intervalos foram identificados na avaliação estrutural como sendo projeções citoplasmáticas dos astrócitos e microglia. Em neurônios do lado contralateral, os terminais estão agrupados e com número menor de intervalos entre os inputs. Os intervalos deste grupo chegaram até 1,6  $\mu\text{m}$  (Figura 62A). Entretanto, no grupo em que foi realizada apenas a axotomia, observou-se aumento da frequência de intervalos entre terminais, bem como de suas dimensões, as quais atingiram até 4  $\mu\text{m}$  (Figura 62B). Nos grupos em que foi realizado o reparo, os intervalos atingiram até 2  $\mu\text{m}$  (grupo AX+SF, Figura 62C) e 2,4  $\mu\text{m}$  (grupo AX+SFC, Figura 62D).



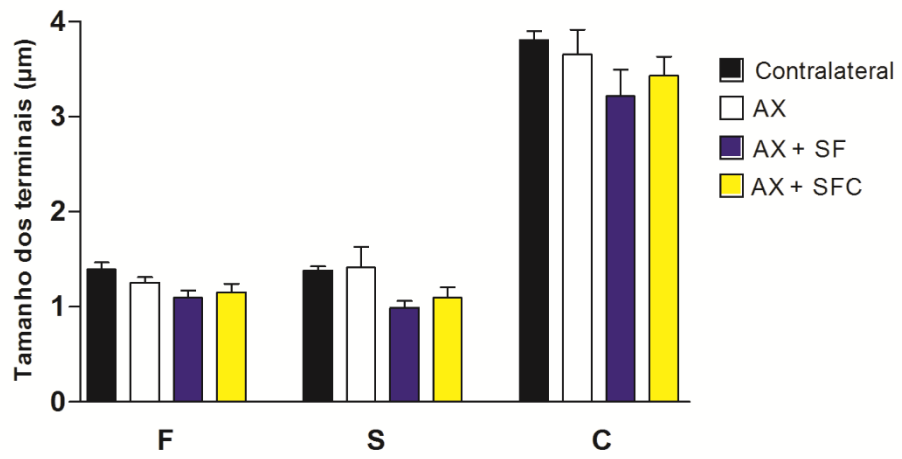
**Figura 58.** Ultraestrutura da superfície de motoneurônios alfa medulares na região dorso lateral da medula, mostrando a cobertura sináptica. **A.** Lado contralateral; **B.** Cobertura sináptica com terminais retraídos e projeções astrocitárias (\*) no grupo axotomia (AX); **C.** Grupo em que foi realizado o reparo com selante de fibrina derivado do veneno de serpente (AX+SF); **D.** Grupo onde foi realizado o reparo com selante de fibrina comercial (AX+SFC). Escala: 500 nm.



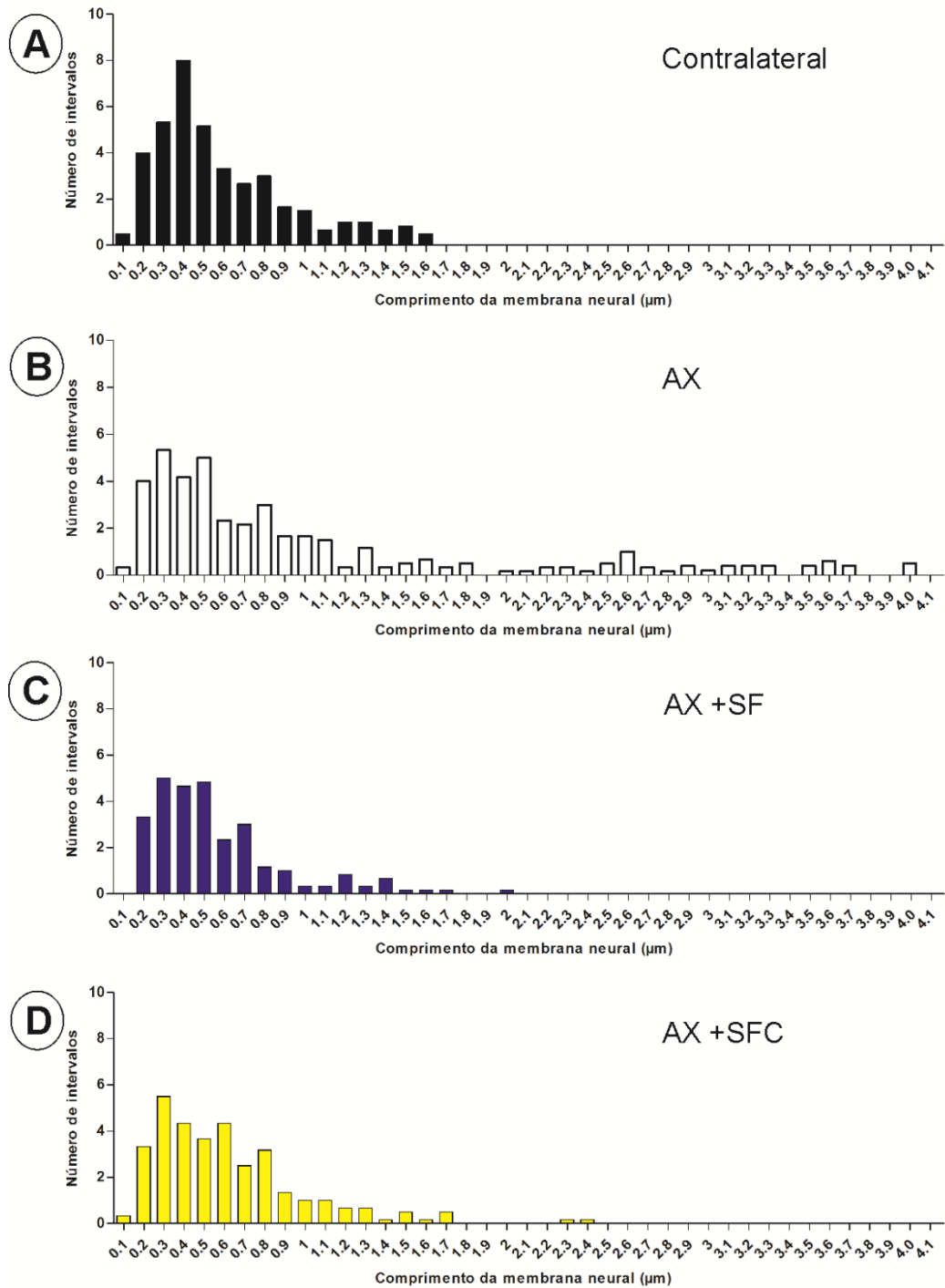
**Figura 59.** Representação gráfica da análise quantitativa ultraestrutural dos tipos de terminais F, S e C, 4 semanas após axotomia e reparo. Porcentagem de cobertura sináptica total (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Média  $\pm$  erro padrão;  $n=3$ .



**Figura 60.** Representação gráfica da análise quantitativa ultraestrutural dos tipos de terminais F, S e C, 4 semanas após axotomia e reparo. Número de terminais sinápticos F, S e C em posição/100  $\mu\text{m}$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ); Média  $\pm$  erro padrão;  $n=3$ .



**Figura 61.** Representação gráfica da análise quantitativa ultraestrutural dos tipos de terminais F, S e C, 4 semanas após axotomia e reparo. Tamanho dos terminais; Média  $\pm$  erro padrão; n=3.

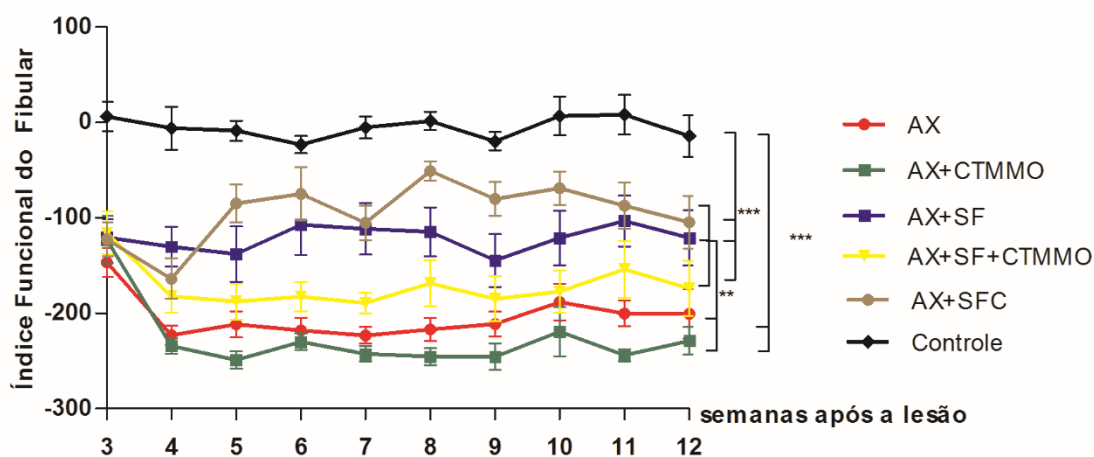


**Figura 62.** Distribuição dos intervalos entre terminais sinápticos ao longo da membrana do corpo dos motoneurônios, 4 semanas após axotomia. **A.** distribuição normal dos intervalos entre os terminais pré-sinápticos. **B.** alteração da distribuição dos terminais pré-sinápticos devido à retração. **C e D.** restauração dos intervalos ao longo da membrana dos motoneurônios.



## 5.8. Avaliação Motora

A avaliação motora da recuperação funcional foi avaliada através do “walking track test” (CatWalk), até 12 semanas pós lesão. Para o cálculo do índice funcional do nervo fibular, foram utilizados dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo, bem como entre o terceiro dedo e o calcanhar. A figura 63 mostra os valores médios quanto ao índice funcional do fibular nos diferentes grupos e momentos da avaliação funcional. O grupo sem lesão permaneceu estatisticamente melhor em relação aos outros grupos. Na análise intergrupos verifica-se que, os grupos em que foi realizado o reparo com selante (AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC) obtiveram melhor recuperação motora em relação aos grupos em que foi realizada apenas a axotomia (AX e AX+CTMMO). O grupo AX+SFC foi melhor que o grupo AX+SF em alguns pontos. Entretanto, o selante de fibrina produzido pelo CEVAP/UNESP, também teve uma resposta positiva em relação a recuperação motora.



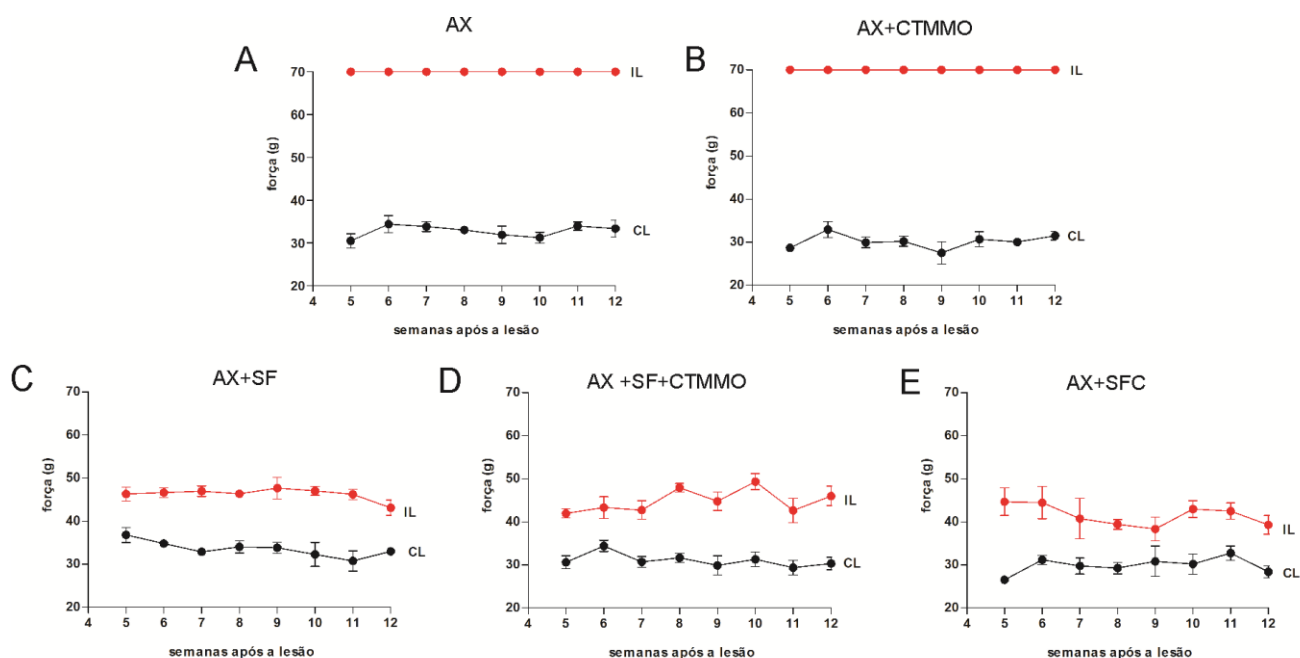
**Figura 63.** Análise da função motora dos animais com oito semanas após a lesão. AX- axotomia; AX+SF- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina derivado da peçonha de serpente; AX+SF+CTMMO- axotomia, seguida de reparo com selante e tratamento com células tronco; AX+CTMMO- axotomia seguida de tratamento com células tronco; AX+SFC- axotomia seguida de reparo com selante de fibrina comercial; Controle, sem lesão (\*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001).

## 5.9. Avaliação Sensitiva

A percepção de dor foi avaliada pelo teste von-Frey eletrônico. A força foi aplicada nas duas patas dos animais de todos os grupos, e não houve alteração significativa entre e inter grupos nas medidas da pata não lesionada ao longo do tempo (Figura 64A). Já para a pata lesionada, observa-se uma diferença entre grupos ( $p < 0.001$ ) (Figura 64B).

Foi realizada uma padronização de medida da seguinte maneira: se a força aplicada ultrapassasse 70g, o animal seria considerado com anestesia total da região plantar e a medida em gramas marcada seria 70g. Não foi possível ultrapassar essa medida, pois a força seria muito grande e poderia ferir a pata dos animais e, além disso, o aparelho marca com acurácia apenas medidas até 80g. Assim sendo, quanto maior a média em gramas no gráfico, maior é a anestesia da região plantar e, portanto, pior é a condição clínica do animal. Quanto mais as medidas se afastam de 70g, melhor está a recuperação da sensibilidade. Reações exageradas que poderiam sugerir o quadro clínico de alodinia não foram observadas em nenhum dos animais.

Observa-se que, desde a primeira semana de teste até o final, os valores de força dos grupos em que não foi realizado o reparo (AX e AX+CTMMO) permaneceram próximo aos 70g, indicando anestesia total. Tais resultados indicam a falta de recuperação nociceptiva nos períodos observados. Entretanto, a medida do limiar de nocicepção nos grupos em que foi realizado o reparo com ambos os selantes de fibrina, e com ou sem células tronco (grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC) foi significativamente melhor (ao redor de 45g), indicando recuperação nociceptiva em todos os períodos analisados. A resposta para a pata não lesionada foi ao redor de 30g.



**Figura 64.** Gráfico das médias por grupo das medidas no teste de nocicepção sensitiva. **A.** grupo axotomia (AX); **B.** grupo axotomia, seguida de tratamento com CTMMO; **C.** grupo axotomia, seguido de reparo com selante de fibrina (AX+SF); **D.** grupo axotomia, seguido de reparo com selante de fibrina e tratamento com CTMMO (AX+SF+CTMMO); **E.** grupo axotomia, seguido de reparo com selante de fibrina comercial (AX+SFC). Os gráficos expressam o valor bruto em gramas da força aplicada para gerar o arco-reflexo, força g, ( $p < 0.001$ ).

## 6. Discussão

O sistema nervoso (SN) é muito sensível a lesões e sua regeneração é um processo complexo e limitado (9), geralmente resultando em sequelas. Embora o SN, na fase neonatal, apresente maior capacidade regenerativa, os neurônios ainda se apresentam imaturos morfológica e funcionalmente (35), sendo mais sujeitos a processos degenerativos. Assim, este torna-se um modelo animal interessante para o estudo de estratégias reparativas que envolvam neuroproteção. O emprego do selante de fibrina produzido pelo CEVAP, bem como o emprego de células tronco mononucleares, se adequam nessa linha de investigação neuroprotetora, podendo apresentar resultados positivos e com aplicação clínica viável. Diante desse contexto, o presente trabalho propôs o reparo do nervo isquiático com selante de fibrina e o uso de células tronco mononucleares, viabilizando a regeneração axonal e redução da degeneração de motoneurônios e neurônios sensitivos.

Estudos sobre reparo de lesão nervosa periférica, em animais adultos, mostram que o selante de fibrina, quando comparado com sutura convencional, apresentou a mesma eficácia. Entretanto, no momento da cirurgia, o selante é mais fácil e rápido para realização do reparo, sendo uma técnica muito interessante para ser utilizada em cirurgias de reparo nervoso, além de tornar o ambiente mais adequado à regeneração, diminuindo a inflamação e formação de granulomas no local (101,102). Rodrigues *et. al* mostraram que os nervos isquiáticos reparados pelo selante de fibrina regeneraram e foram capazes de conduzir impulsos nervosos ao músculo extensor longo dos dedos (EDL), resultando em contração semelhante aos músculos no grupo que não foi realizada lesão. (103)

O selante de fibrina ideal para reparação de nervos deve apresentar propriedades biológicas (apresentar mínimo risco de transmissão de doenças ou toxicidade) e mecânicas (não induzir fibrose, que pode levar à compressão do nervo). Além disso, deve ser de fácil utilização, reduzindo assim o tempo de cirurgia (104).

A possibilidade de se produzir um selante de fibrina, cujo fator polimerizador é derivado da peçonha de serpente, abre uma importante opção para utilização clínica, no reparo de nervos periféricos e de lesões medulares. Possui vantagens em relação ao selante comercial, como a possibilidade de formulação personalizada à necessidade da cirurgia, levando-se em conta o tempo de coagulação necessário, bem como o controle do tempo de degradação do selante. Adicionalmente, seu custo de produção é mais baixo, visto que a tecnologia é totalmente nacional (50, 51, 56). Além disso, observamos que, no momento da cirurgia, ambos selantes são satisfatórios para realização do reparo. Entretanto, o selante de fibrina do CEVAP se mostrou mais eficiente no momento de realizar o reparo, quando comparado com o selante comercial, pois o tempo que a malha de fibrina é formada foi um pouco maior, permitindo que a técnica de junção entre os cotos proximal e distal, separados pela axotomia, fosse feita cuidadosamente. Devido ao fato da cirurgia ser realizada em neonatos, deveríamos ter um selante que apresentasse o momento ideal para polimerização da malha de fibrina, pois o tempo não pode ser muito longo, pela anestesia ser feita por hipotermia e nem muito curto, para não atrapalhar no momento do

reparo. Isso foi possível, pois o selante de fibrina do CEVAP nos proporcionou uma formulação personalizada para este tipo de cirurgia e apresenta propriedades biológicas e mecânicas favoráveis.

Iuan et al. (1995) mostraram que o selante derivado do veneno de serpente produziu resultados similares ao selante comercial, propiciando aderência adequada e reparação do nervo isquiático após lesão em ratos (60). O uso do selante de fibrina associado ou não à terapia com laser ao tratamento de lesão do nervo isquiático também mostrou resultados promissores (61) e Cunha et al. (2015) obtiveram sucesso na reparação de defeitos no crânio utilizando o mesmo selante (62). Este produto está sendo utilizado em vários campos de pesquisa, com roedores e não roedores, além de ser analisado no tratamento de úlceras venosas em humanos (59).

É importante ressaltar que, além do selante de fibrina causar menos danos ao tecido saudável, em comparação aos demais métodos propostos, também possibilita a adição da terapia celular, ainda no processo adesivo, atuando como *scaffold*. As células tronco se mostram promissoras para o reparo do SN, uma vez que o seu implante diretamente na medula espinal promoveu melhora funcional em diferentes modelos experimentais (105-109). Além disso, já foi estabelecido que o selante de fibrina derivado da peçonha de serpentes pode ser utilizado como *scaffold* para as células tronco, permanecendo aderidas à sua superfície (69). Outros trabalhos com este mesmo selante mostraram que as células mononucleares ainda estavam presentes, após 8 semanas do tratamento de lesão de raiz sensitiva (67). Ainda, as células mesenquimais são positivas, em processo de tubulização no reparo do nervo isquiático, com a visualização após 60 dias de tratamento, sugerindo que tais células permanecem ativas durante o processo regenerativo, possibilitando a liberação de fatores neurotróficos que atuam na manutenção de células de Schwann, benéficas na regeneração nervosa, no local da injúria (68).

Os primeiros estudos com células tronco surgiram em cardiologia e mostraram resultados promissores (76,110), incentivando a utilização dessas células como forma de tratamento em outras situações clínicas. Foi também observado seu potencial neuroprotetor em lesão do sistema nervoso periférico (82,111) e medula espinal (112).

As CTMMO possuem vantagens clínicas em relação às outras células tronco, pois o procedimento para sua obtenção é minimamente invasivo na prática médica, com menor tempo e custo de processamento, dispensa a utilização de imunossupressores, possui baixo potencial oncogênico e não esbarra em problemas éticos (82), com similar potencial terapêutico na regeneração nervosa que outras células tronco, como as mesenquimais (112, 113).

Outra possibilidade do efeito neuroprotetor promovido pelas células tronco pode estar associado à produção local de fatores neurotróficos, capazes de ampliar e promover a regeneração de fibras nervosas no sítio da lesão (73, 74) e influenciar positivamente na sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica (82).

No presente trabalho, o protocolo utilizado para extração e caracterização de células tronco mononucleares da medula óssea mostrou-se eficiente e as células isoladas mantiveram uma boa viabilidade celular, quando mantidas sob refrigeração (- 4°C). Padronizamos em transplantar as células somente no dia da extração e mantê-las refrigeradas até pouco antes do uso, pois quando mantidas em temperaturas mais altas (37°C), o número de células viáveis diminui significativamente, o que provavelmente teria impacto no sucesso do procedimento. A citometria de fluxo confirmou a presença de células mononucleares e corrobora os resultados obtidos por Benitez et al. (2014) que apresentaram porcentagens maiores para os marcadores de superfície celular CD45 (92.2%) e CD34 (20.8%) (67).

A fração celular mononuclear pode auxiliar na reparação, por meio da expressão do potencial proliferativo, imunomodulador e quimiotático desse material biológico, além de estimular a síntese da matriz extracelular, liberar citocinas (fatores de crescimento) e apresentar efeito antiinflamatório (114). Em termos médicos, essas células são obtidas do próprio paciente (transplante autólogo), descartando risco de rejeição, além de sua obtenção e manipulação ser fácil e de relativo baixo custo, podendo ser rotineiramente utilizado (82).

O selante de fibrina derivado da peçonha da serpente *Crotalus* também foi associado a terapia de células tronco mononucleares no reimplante de raízes nervosas dorsais e ventrais, agindo como um substrato para o crescimento axonal e auxiliando na manutenção da homeostase

no microambiente adjacente à lesão (65-67).

A administração celular imediata aumenta a sobrevivência dos motoneurônios, após avulsão de raízes nervosas, portanto optamos em fazer o tratamento no momento do reparo com o selante (115). Entretanto, em nosso estudo, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos submetidos somente ao reparo, comparando com aqueles reparados pelo reparo associado à terapia celular. Barbizan et al. (2014), apresentaram resultados similares utilizando a injeção de células mononucleares juntamente com selante de fibrina do CEVAP em lesões de raízes ventrais, concluindo que apenas o selante já foi suficiente para o reparo (116).

Efeitos benéficos foram observados quando utilizadas células tronco mononucleares da medula óssea em lesão de nervo isquiático em ratos adultos, empregando-se volume de  $10^7$  células/100 $\mu$ LPBS. Entretanto, quando foi utilizado menor número de células ( $5 \times 10^6$ /100 $\mu$ LPBS), onde os resultados não foram satisfatórios (117). Neste trabalho foram utilizadas  $1 \times 10^6$  células no local da injúria. No caso de cirurgia neonatal, o espaço para cirurgia é muito reduzido, inviabilizando o uso de grandes volumes de soluções para tratamento, o que pode ter interferido na eficácia das células tronco. Entretanto, resultados de tratamento de lesões de raízes ventrais, em que foram utilizadas  $3 \times 10^5$ , células também não obtiveram sucesso (116).

Cartarozzi et al. (2015) mostraram que o selante de fibrina do CEVAP, em combinação com o tratamento com células tronco mesenquimais, após reparo do nervo isquiático em ratos, por meio da tubulização, gerou melhor índice motor e maior expressão do anticorpo p75<sup>NTR</sup>. Entretanto, os mesmos autores não observaram diferenças em relação às análises morfométricas e à área do nervo entre o grupo que utilizou apenas o selante, ou quando este foi associado à células (68).

Sugerimos, portanto que, em trabalhos posteriores, seja realizada a verificação da presença de células mononucleares 4, 8 e 12 semanas após lesão, além de imunoistoquímica para avaliar a expressão de anticorpos para fatores de crescimento, entre outros, no nervo isquiático.

Experimentos anteriores mostraram que a transecção do nervo isquiático de ratos no dia do nascimento (P0), leva à morte de 53 a 89% dos neurônios sensitivos axotomizados, além de



provocar perda de praticamente todos os motoneurônios atingidos (33, 34). Os presentes resultados demonstraram que o reparo com selante de fibrina, quando associado ou não à CTMMO, preservou um número significativo de motoneurônios (aproximadamente 54%), quando comparado aos grupos em que foi realizada apenas a axotomia ou quando associada a tratamento com CTMMO sem reconstrução do nervo (aproximadamente 20%). No grupo axotomia, não há reconexão do motoneurônio com o músculo alvo e os fatores neurotróficos que são liberados no coto distal do nervo não são transportados até os corpos neuronais na medula, resultando em degeneração celular (118). Sendo assim, a maior parte dos motoneurônios havia degenerado no grupo em que não houve o reparo, o que não ocorreu com os outros grupos experimentais em que este foi realizado.

Após uma lesão, que resulte na interrupção do contato entre o motoneurônio e as fibras musculares, ocorre retração de botões sinápticos da superfície da célula axotomizada (119, 120). Esta perda significativa dos botões sinápticos em neurônios axotomizados, no período agudo pós-lesão, diminui ou mesmo extingue a transmissão sináptica (121 -123). No caso da reinervação com o órgão alvo não ocorrer, tais alterações sinápticas podem se tornar irreversíveis (121). Neste estudo, a cobertura sináptica foi significativamente preservada no microambiente circunjacente aos motoneurônios da medula espinal nos grupos AX+SF, AX+SF+CTMMO e AX+SFC em todos os períodos analisados.

Juntamente às alterações sinápticas observadas no corpo dos motoneurônios, as células da glia tornam-se reativas diante de lesões no SNC. A gliose reativa é caracterizada pela hipertrofia do corpo e processos celulares dos astrócitos e pela hiperplasia microglial (124-127). A GFAP é uma proteína super expressa em astrócitos após lesões no SN, membro dos filamentos intermediários, compondo parte do citoesqueleto dos astrócitos (128). A reatividade astrogliar diminuiu após reparo somente com selante de fibrina (AX+SF, AX+SFC) ou quando este foi combinado com tratamento de CTMMO (AX+SF+CTMMO). Tal fato indica que o reparo foi importante para impedir a progressão da gliose reativa.

No período agudo (primeiras semanas após a lesão) foram observadas diferenças significativas entre os grupos, no que diz respeito à reatividade morfológica das células microgliais.

Contudo, com oito e 12 semanas não houve diferença entre os grupos, tanto na resposta dos astrócitos, quanto da microglia. Isso pode ser explicado pelo tempo que a microglia e astrócitos reagem para modificar o microambiente medular, que acontece nas primeiras semanas pós lesão (111,113). Entretanto, como descrito na literatura, essas células, num segundo momento, apresentam características fagocíticas importantes para o reparo tecidual (129, 131), removendo também fragmentos de células apoptóticas ou necróticas. A microglia é o principal tipo celular com essa função, no entanto, agora sabe-se que outras células, como os astrócitos, também auxiliam nesse processo (132). Estes são capazes de retrair sinapses de forma reversível, mostrando que respondem às alterações no seu microambiente, como em lesões do sistema nervoso (133,134).

Foi demonstrado que o reparo utilizando o selante de fibrina possibilita a regeneração axonal, gera maior área do nervo e, conseqüentemente, recuperação funcional e sensitiva, mostrando, mais uma vez, a eficácia dos selantes, tanto do extraído de veneno de serpente e crioprecipitado bubalino, quanto dos comerciais (utilizando hemoderivados humanos).

Os resultados apontam que, em todos os grupos experimentais (exceto o grupo controle), houve diminuição acentuada do número de axônios mielínicos, indicando morte neuronal acarretada pela lesão (135). Entretanto, obtivemos maior número de axônios mielínicos nos grupos onde houve o reparo, quando comparado ao grupo que foi realizada apenas a axotomia, sendo que neste não foi encontrado nenhum axônio sobrevivente. Os dados sugerem a ocorrência de regeneração das fibras motoras, nos grupos experimentais onde houve o reparo. Os valores obtidos referentes ao número de axônios mielínicos presentes no nervo isquiático, para o grupo controle, coincidem com a literatura, com cerca de 7.800 fibras (136). A área do nervo foi significativamente menor no grupo controle com quatro semanas, o que pode ser explicado devido o animal estar em fase de desenvolvimento, pois com oito e doze semanas não houve diferença.

Um processo, denominado degeneração Walleriana, ocorre quando um nervo é axotomizado e os axônios e bainha de mielina degeneram. Entretanto, quando há sucesso na reparação do nervo, os neurônios mudam para um estado de regeneração, ao invés de permanecer em estado de transmissão sináptica, para tentar se recuperar. Isso ocorre no sentido próximo-distal, em relação à lesão (137). Wood et al. (2013) avaliaram o efeito do tratamento com

GDNF e selante de fibrina após reparo tardio do nervo e observaram que o número de fibras mielínicas foi significativamente maior no grupo que recebeu o tratamento, duas semanas após axotomia, comparado com o grupo que recebeu o tratamento quatro semanas pós lesão (aproximadamente 3.000 e 2.000 axônios, respectivamente) (138). Nossos resultados corroboram com a literatura, mostrando aproximadamente 2.500 axônios após o reparo com ambos os selantes.

Os resultados relativos aos parâmetros morfométricos, analisados neste trabalho, revelaram axônios e fibras estatisticamente menores em relação aos diâmetros do axônio e da fibra e menor espessura de mielina, no grupo em que foi realizado o reparo com selante de fibrina comercial (AX+SFC). Similarmente, quando o reparo foi realizado com selante do CEVAP e adição de células mononucleares (AX+SF+CTMMO), tais parâmetros foram estatisticamente inferiores ao reparo realizado com selante do CEVAP sem tratamento adicional, com 4 semanas de sobrevivência. Estes resultados, em relação ao uso do selante de fibrina comercial, podem ser explicados devido ao fato da polimerização da fibrina ocorrer mais rapidamente, influenciando no momento do reparo ao unir os cotos proximal e distal. Em relação ao grupo em que foi utilizado o selante de CEVAP mais adição de células tronco mononucleares ter respostas similares à do comercial, pode estar relacionado à uma eventual diluição dos componentes da cola, diminuindo a estabilidade do reparo. Apesar disso, todos os grupos em que foi realizado o reparo mostraram regeneração significativamente superior, quando comparados com os grupos em que foi realizada apenas a axotomia, sem reparo. Além disso, com 8 e 12 semanas, todos os grupos foram similares entre si (excetuando-se o grupo sem reparo, que não apresentou fibras regeneradas).

Conradi, em 1969, classificou os terminais pré- sinápticos, em contato com o corpo celular dos motoneurônios medulares, de acordo com a morfologia e tamanho de suas vesículas sinápticas em S, F e C (96). Os terminais do tipo S (*Spherical*) contêm vesículas sinápticas esféricas e, seu neurotransmissor é o glutamato, um aminoácido excitatório que pode, após uma lesão, promover exacerbada entrada de íons  $Ca^{2+}$  na célula pós-sináptica; este evento denomina-se excitotoxicidade glutamatérgica e pode causar neurodegeneração. Os terminais do tipo F (*Flattened*) apresentam vesículas sinápticas achatadas, com presença dos neurotransmissores

inibitórios glicina e GABA (96, 139). Os terminais sinápticos do tipo C são excitatórios e colinérgicos e, apresentam cisterna localizada sob a membrana pós-sináptica, denominada de cisterna subsináptica. Após lesão proximal ocorre, também, remodelação estrutural e funcional dos circuitos dos motoneurônios, denominada plasticidade sináptica. Esta, foi analisada neste trabalho, através de microscopia eletrônica de transmissão.

A análise ultraestrutural da medula espinal foi realizada apenas nos grupos em que foi realizada axotomia (AX), reparo com selante de fibrina do CEVAP (AX+SF) e reparo com selante de fibrina comercial (AX+SFC), 4 semanas após lesão do nervo isquiático. Ambos os selantes diminuíram a perda sináptica e reduziram a eliminação de terminais após axotomia. A análise quantitativa da porcentagem de cobertura total para cada tipo de terminal sináptico (S, F e C) mostrou que houve diminuição significativa nos inputs inibitórios (tipo F- 30,07% menos) e excitatórios (tipo S- 41,22% menos) no grupo em que foi realizada apenas a axotomia. Além disso, nossos resultados demonstram que o tipo de terminal mais afetado foi o excitatório (S), com diferença significativa entre os grupos AX e AX+SFC, quando comparados com o grupo contralateral. Apesar disso, o grupo AX+SFC não foi diferente do grupo AX+SF nesta condição. Esses resultados, podem facilitar a neuroproteção com a preferência pelos motoneurônios em manter terminais sinápticos do tipo F, pois a excitotoxicidade é diminuída devido à maioria de terminais glutamatérgicos (tipo-S) estarem retraídos do corpo celular, levando o neurônio à um estágio de recuperação (26-28). Além da prevenção da excitotoxicidade, o número de terminais sinápticos/100µm em aposição à membrana neuronal também foi maior e os intervalos entre os terminais foram menores nos grupos em que foi realizado o reparo.

É de fundamental importância o desenvolvimento de terapias que auxiliem não somente na recuperação das sinapses e redução da resposta glial, mas também reflitam em uma melhora funcional. A análise do índice funcional do nervo fibular nos fornece dados confiáveis sobre a recuperação funcional de animais com problemas motores (140) e é um método não invasivo, de baixo custo e quantitativo (140-142). Os animais nos quais foi realizado o reparo, analisados até 12 semanas pós-operatórios, apresentaram melhora motora estatisticamente significativa no índice fibular, em comparação aos animais nos quais foi realizada apenas a axotomia. A melhora motora

observada nos animais tem grande relevância, pois a marcha exige restabelecimento da unidade motora, da sensibilidade e do controle do córtex cerebral (142).

O grupo no qual foi realizada o reparo com selante de fibrina comercial (AX+SFC) foi melhor em comparação ao grupo em que foi utilizado o selante derivado do veneno de serpente (AX+SF), em alguns pontos. Entretanto, o selante de fibrina produzido pelo CEVAP/UNESP, também apresentou uma resposta positiva em relação à recuperação motora.

Além do Catwalk, optamos pela avaliação da recuperação da função sensorial nociceptiva utilizando o aparelho von-Frey eletrônico. Tal método avalia o limiar nociceptivo mecânico. A medida do limiar de nocicepção no grupo em que foi realizado reparo com selante de fibrina foi significativamente melhor que o grupo em que foi realizada apenas a axotomia, pois os animais apresentaram limiar de nocicepção aplicando-se menos força sob a pata, indicando recuperação nociceptiva em todos os períodos analisados. A pata do lado contralateral serviu como Controle e não foi observada diferença entre os grupos. Resultados similares, utilizando o mesmo teste nociceptivo, foram encontrados em animais neonatos que sofreram lesão no nervo isquiático, sendo a força g 80g, para animais lesionados e 30g para os controles (143). Vega-Avelaira et al. (2012), relataram que os ratos iniciaram a demonstrar nocicepção 21 dias após axotomia, mesmo tempo em que o teste foi iniciado neste projeto (144).

## **7. Conclusões**

Os resultados apresentados revelam a ocorrência de neuroproteção e recuperação motora e sensitiva, tanto nos grupos em que foi realizado apenas o reparo com selante de fibrina, quanto nos grupos em que foi realizado o reparo, seguido de tratamento com CTMMO. Em conjunto, o reparo do nervo com o selante fibrina resultou em:

- Neuroproteção, evidenciada pela sobrevivência neuronal;
- Diminuição da astrogliose reativa e da reatividade microglial, evidenciada pela imunistoquímica;
- Manutenção de cobertura sináptica, principalmente de inputs inibitórios, observada por imunistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão;

- Maior número de fibras nervosas regeneradas;
- Recuperação funcional motora, evidenciada pelo “walking track test” – índice do nervo fibular.
- Melhora nociceptiva, evidenciada pelo teste de von-Frey;
- O selante de fibrina do CEVAP foi mais prático no momento do reparo do nervo isquiático, em relação ao selante comercial.

## 8. Referências

1. Amaral DG. The anatomical organization of the Central Nervous System. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM editors. Principles of neural science. 4<sup>th</sup> ed. New York:McGraw-Hill;2000. Chapter 17, p-318-336.
2. Oppenheim RW, Chu-Wang IW. Developmental neuron death in the rat superior cervical sympathetic ganglion: cell counts and ultrastructure. *J Neurocytol.* 1983;2(5):727-38.
3. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Ann Rev Neurosci.* 1991;14:453-501.
4. Hamburger V. Regression versus peripheral control of differentiation on motor hypoplasia. *Am J Anat.* 1958;102:365-409.
5. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987;237:1154-62.
6. Oliveira ALR, Risling M, Negro A, Langone F, Cullheim S. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by NGF and CNTF. *J Comp Neurol.* 2001;447:381-93.
7. Linden R. The survival of developing neurons: a review of afferent control. *Neuroscience.* 1994;58:671-82.
8. Oliveira ALR, Risling M, Negro A, Langone F, Cullheim S. Apoptosis of spinal Interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. *J Comp Neurol.* 2002;447:381-93.
9. Moran LB, Graeber MB. The facial nerve axotomy model. *Brain Res Rev.* 2004;44:154-78.
10. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194:1-14.
11. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.* 1996;76:319-70.
12. Tator CH. Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. *Neurosurgery.* 1998;42:696-701.
13. Wroblewski R, Roomans GM, Kozlova EN. Effects of dorsal root transection on morphology and chemical composition of degenerating nerve fibers and reactive astrocytes in the dorsal funiculus.



Experim Neur. 2000;164:236-45.

14. DeLeo JA, Tawfik VL, LaCroix-Fralish ML. The tetrapartite synapse: path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain*. 2006;22:17-21.

15. Malessy MJA, Pondaag W. Obstetric Brachial Plexus Injuries. *Neurosurg Clin North Am*. 2009;20(1):1-14.

16. IJkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004;25(9):1583-92.

17. Seddon HJ. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Br J Surg*. 1947;35:151-67.

18. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral Nerve Injury and Repair. *J Am Acad Orthop Surg*. 2000;8:243-52.

19. Aldskogius H, Liu L, Svensson M. Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J Neurosci Res*. 1999;58(1):33-41.

20. Risling M, Fried K, Linda H, Cullheim S, Deckner M. Changes in nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the spinal cord after ventral funiculus lesion in adult cats. *J Neurocytol*. 1992;21:70-93.

21. Kobayashi NR, Fan DP, Giehl KM, Bedard AM, Wiegand SJ, Tetzlaff W. BDNF and NT4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and Talpha1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci*. 1997;17:9583-95.

22. Novikov L, Novikova L, Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion. *Neurosci Lett*. 1995;200:45-8.

23. Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Linda H, van der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci*. 2000;20: 5283-91.

24. Linda AH, Piehl F, Dagerlind A, Verge VM, Arvidsson U, Cullheim S, Risling M, Ulfhake B, Hökfelt T. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. *Exp Brain Res*. 1992;91(2):284-95.

25. Piehl F, Hammarberg H, Hokfelt T, Cullheim S. Regulatory effects of trophic factors on expression and distribution of CGRP and GAP-43 in rat motoneurons. *J Neurosci Res.* 1998;51:1-14.
26. Linda H, Shupliakov O, Örnung G, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Risling M, Cullheim S. Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons after intramedullary axotomy. *J Comp Neurol.* 2000;425:10-23.
27. Cullhiem S, Wallquist W, Hammarberg H, Linda H, Piehl F, Carlstedt T, Risling M. Properties of motoneurons underlying their regenerative capacity after axon lesions in the ventral funiculus or at the surface of the spinal cord. *Brain Res Rev.* 2002;40:309-16.
28. Oliveira ALR, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hokfelt T, Karre K, Linda H, Cullhiem S. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2004;101(51):17843-48.
29. Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle & Nerve.* 1990;13(9):771-84.
30. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 2011;8:110-23.
31. Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl.* 2000;9:S33-38.
32. Lowrie MB, Lavalette D, Davis CE. Time course of motoneurons death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. *Dev Neurosci.* 1994;16:279-84.
33. Schmalbruch H. Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in the rat. *Anat Rec.* 1987;219:323-29.
34. Schmalbruch H. The effect of peripheral nerve injury on immature motor and sensory neurons and on muscles fibres. Possible relation to the histogenesis of Werdnig-Hoffmann disease. *Rev Neurol.* 1988;144:721-9.
35. Lowrie MB, Vbrová G. Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. *Trends Neurosci.* 1992;15:80-4.
36. Kashihara Y, Kuno M, Miyata Y. Cell death of axotomized motoneurons in neonatal rats and its prevention by peripheral reinnervation. *J Physiol.* 1987;386:135-48.

37. Fields RD, LeBeau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol.* 1989;33:87-134.
38. Lundborg G. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. *J Hand Ther.* 1993;6(3):179-88.
39. De Vries J, Menovisky T, Gulik S, Wesseling P. Histological effects of fibrin glue on nervous tissue. A safety study in rats. *Surg Neurol.* 2002;57:415-22.
40. Lee KC, Park SK, Lee KS. Neurosurgical application of fibrin tissue. *Yon Med J.* 1991;32:53-7.
41. Busuttill RW. A comparison of antifibrinolytic agents used in hemostatic *fibrin sealants*. *J Am Coll Surg.* 2003;197(6):1021-8.
42. Alving BM, Weinstein MJ, Finlayson JS, Menitone JE, Fratantoni JC. Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses. *Transfusion.* 1995;35:783-90.
43. Radosevich M, Goubran HI, Burnouf T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang.* 1997;72(3):133-43.
44. Phillips M, Dickneite G, Metzner H. Fibrin sealants in supporting surgical techniques: strength in factor XIII. *Cardiovasc Surg.* 2003;1:13-6.
45. Homminga GN, Buma P, Koot HW, Van der Kraan PM, Van den Berg WB. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Biomaterials.* 1998;24:2367-74.
46. Gille J, Meisner U, Ehlers EM, Muller A, Russlies M, Behrens P. Migration pattern, morphology and viability of cells suspended in or sealed with fibrin glue: A histomorphologic study. *Tiss Cell.* 2005;37:339-48.
47. Sawamura Y, Asaoka K, Terasaka S, Tada M, Uchida T. Evaluation of application techniques of fibrin sealant to prevent cerebrospinal fluid leakage: a new device for the application of aerosolized fibrin glue. *Neurosurg.* 1999;44(2):332-7.
48. Baumgartner L, Arnhold S, Brixius K, Addicks K, Bloch W. Human mesenchymal stem cells: Influence of oxygen pressure on proliferation and chondrogenic differentiation in fibrin glue in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93:930-40.
49. Kang EJ, Byun JH, Choi YJ, Maeng GH, Lee SL, Kang DH, Lee JS, Rho GJ, Park BW. In vitro and in vivo osteogenesis of porcine skin-derived mesenchymal stem cell-like cells with a demineralized bone and fibrin glue scaffold. *Tissue Eng.* 2010;16(3):815-27.

50. Barros LC, Ferreira Junior RS, Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJS, Toscano E, Barraviera B. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *J Toxicol Environ Health*. 2009;12:553-71.
51. Ferreira ASSBS, Barraviera B, Barraviera SRCS, Abbade LPF, Caramori CA, Ferreira Junior RS. A success in Toxinology translational research in Brazil: Bridging the gap. *Toxicon (Oxford)*. 2013;69:50-4.
52. Raw I, Rocha MC, Esteves MI, Kamiguti AS. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz J Med Biol Res*. 1986;19:333.
53. Ouyang C, Teng CH, Huang TF. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon*. 1992;30(9):945-66.
54. Pirkle H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: An update inventory. *Thromb Haemost*. 1998;79:675-83.
55. Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:843-56.
56. Costa FLS, Rodrigues RS, Izidoro LFM, Menaldo DL, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, Fuly AL, Soares SG, Selistre de Araujo HS, Barraviera B, Soares AM, Rodrigues VM. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*. 2009;54:725-35.
57. Viterbo F, Thomazini IA, Gianinni MJSM. Reparação de nervos periféricos com cola de fibrina derivada de veneno de cobra. Resultados Preliminares. *Acta Cirurg Bras*. 1993;2:85.
58. Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM, Toscano E, Machado PEA, Lima CRG, Barraviera B. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, Reptilase®, and thrombin-like fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom using bovine, equine, ovine, bubaline and human cryoprecipitates. *J Venom Anim Toxins*. 1998;4:120-36.
59. Gatti MAN, Vieira LM, Barraviera B, Barraviera SRCS. Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2011;17(2):226–29.
60. Iuan FC, Thomazini IA, Gianini MJM, Viterbo F, Toscano E, Moraes RA, Barraviera B. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom – Preliminary results. *Rev Paul Med*. 1995;113:1000-2.
61. Buchaim RL, Andreo JC, Barraviera B, Ferreira Junior RS, Buchaim DV, Rosa Junior GM,

- Oliveira ALR, Rodrigues AC. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *Injury*. 2015;46:655-60.
62. Cunha MR, Menezesa FA, Santos GR, Pinto CAL, Barraviera B, Martinsd VCA, Plepis AMG, Ferreira Junior RS. Hydroxyapatite and a New Fibrin Sealant Derived from Snake Venom as Scaffold to Treatment of Cranial Defects in Rats. *Materials Res*. 2015;18:196-203.
63. Barbosa MDS, Gregghi SLA, Passanezi E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. *J Periodontol*. 2007;78(10):2026–31.
64. Chiquito GCM. Comparison between suture and fibrin adhesive derived from snake venom for fixation of connective tissue graft in correction of marginal tissue recession. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2007;13(2):559.
65. Barbizan R, Castro M, Ferreira Junior RS, Barraviera B, Oliveira ALR. Influence of Delivery Method on Neuroprotection by Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy following Ventral Root Reimplantation with Fibrin Sealant. *Plos One*. 2014;9:e105712.
66. Barbizan R, Castro M, Rodrigues AC, Ferreira Junior RS, Barraviera B, Oliveira ALR. Motor Recovery and Synaptic Preservation after Ventral Root Avulsion and Repair with a Fibrin Sealant Derived from Snake Venom. *Plos One*. 2013;8:e63260.
67. Benitez SU, Barbizan R, Spejo AB, Ferreira Junior RS, Barraviera B, Góes AM, Oliveira ALR. Synaptic plasticity and sensory-motor improvement following fibrin sealant dorsal root reimplantation and mononuclear cell therapy. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2014;8:96.
68. Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira Junior RS, Barraviera B, Duek E, Carvalho JL, Goes AM, Oliveira ALR. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulates Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *Brain Res Bull*. 2015;112:14-24.
69. Gasparotto VPO, Alvarenga FCLE, Oliveira ALR, Simoes GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, Ferreira Junior RS. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem cell res ther*. 2014;5:78.
70. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:10711-16.
71. Munoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. Adult bone marrow stromal cells

in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci.* 2004;24:4585-95.

72. Hell RCR, Costa MMS, Góes AM, Oliveira ALR. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol Dis.* 2009;33:290-300.

73. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology.* 2002;59:514-23.

74. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2004;21:33-9.

75. Martino HF, Oliveira PS, Assunção E, Villela R, Gaze M, Costa PCS, et al. Terapia Celular na Cardiomiopatia Dilatada. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(5):390-2.

76. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Simeone BR, Francisco JC, Miyague N, Olandoski M. Functional outcome of bone marrow stem cells: mononuclear versus mesenchymal stem cells after cellular therapy in myocardial scar in Wistar rats. *Transplant Proc.* 2006;38(6):1953-64.

77. Mathieu M, Bartunek JEI, Oumeiri B, Touihri K, Hadad I, Thoma P, et al. Cell therapy with autologous bone marrow mononuclear stem cells is associated with superior cardiac recovery compared with use of nonmodified mesenchymal stem cells in a canine model of chronic myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138(3):646-53.

78. Brenneman M, Sharma S, Harting M, Strong R, Cox CJR, Aronowski J, Grotta JC, Savitz SI. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30:140-9.

79. Capiod JC, Tournois C, Vitry F, Sevestre MA, Daliphard S, Reix T, Nguyen P, Lefrere JJ, Pignon B. Characterization and comparison of bone marrow and peripheral blood mononuclear cells used for cellular therapy in critical leg ischemia: towards a new cellular product. *Vox Sang.* 2009;96(3):256-65.

80. Caldas HC, Fernandes IMM, Gerbi F, Souza AC, Baptista MASF, Ramalho HJ, et al. Effect of Whole Bone Marrow Cell Infusion in the Progression of Experimental Chronic Renal Failure. *Transplant Proceed.* 2008;40:853-5.

81. Braga-Silva J, Gehlen D, Padoin AV, Machado DC, Garicochea B, da Costa J. Can local supply

of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *J Hand Surg Eur.* 2008;33(4):488-93.

82. Goel RK, Suri V, Suri A, Sarkar C, Mohanty S, Sharma MC, Yadav PK, Srivastava A. Effect of bone marrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transection model of the rat sciatic nerve. *J Clin Neurosci.* 2009;16(9):1211-27.

83. Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, Kocsis J. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia.* 2002;39(3):229-36.

84. Sykova E, Jendelova P, Urdziková L, Lesny P, Hejcl A. Bone marrow stem cell and polymer hydrogels- two strategies for spinal cord injury repair. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26:1113-29.

85. Boyüm A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77-89.

86. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1987.

87. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol.* 1952;96:415-96.

88. Grant G, Koerber R. Spinal Cord Cytoarchitecture. In: Paxinos, G editor. The rat nervous system. 3<sup>th</sup> ed. San Diego, California, USA. Elsevier Academic Press;2004. Chapter 5, p- 121-128

89. Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Mendes-Giannini MJS, Barraviera B. Surgical adhesives. *J Venom Anim Toxins.* 2001;7(2):159-71.

90. Barros LC, Soares AM, Costa FL, Rodrigues VM, Fuly AL, Giglio JR, Gallacci M, Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Barraviera B, Ferreira Jr RS. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2011;17(1):23-33.

91. Ferreira Jr RS. Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice? *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2014;20:31.

92. Danneman PJ, Mandrell TD. Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. *Lab An Sci.* 1997;47(4):386-95.

93. Abercrombie M, Johnson ML. Quantitative histology of Wallerian degeneration. *Nuclear*



population in rabbit sciatic nerve. *J Anat.* 1946;80: 37-50.

94. Emirandetti A, Simões GF, Zanon RG, Oliveira ALR. Spinal motoneuron synaptic plasticity after axotomy in the absence of inducible nitric oxide synthase. *J Neuroinflammation.* 2010;24:7-31.

95. Mayhew TM, Sharma AK. Sampling schemes for estimating nerve fiber size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J. Anat.* 1984;139(1):59-66.

96. Conradi S. Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in lumbosacral spinal cord of the adult cat. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1969;332:5-48.

97. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83(1):129-38.

98. Jensen K, Andersen HO, Olesen J, Lindblom U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. *Pain.* 1986;25:313-23.

99. 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;37:391-9.

100. Cunha TM, Verri WA Jr, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:401-7.

101. Knox CJ, Hohman MH, Kleiss IJ, Weinberg JS, Heaton JT, Hadlock TA. Facial Nerve Repair: Fibrin Adhesive Coaptation versus Epineurial Suture Repair in a Rodent Model. *Laryngoscope.* 2013;123(7):1618–21.

102. Suri A, Mehta VS, Sarkar C. Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study. 2002;50:23-6.

103. Rodrigues VAC, Gallacci M, Vicente PC, Santos SMR, da Costa DMN. Recuperação funcional do nervo ciático reparado pela cola de fibrina. *HU Revista, Juiz de Fora.* 2008;34(1)53-6.

104. Tse R, Ko JH. Nerve glue for upper extremity reconstruction. *Hand Clin.* 2012;28(4):529-40.

105. Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport.* 2000;11:3001-5.

106. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad*

Sci. 2002;99:2199–204.

107. Cizkova D, Kakinohana O, Kucharova K, Marsala S, Johe K, Hazel T, Hefferan MP, Marsala M. Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells. *Neurosc.* 2007;147(2):546-60.

108. Hell RCR, Costa MMS, Góes AM, Oliveira ALR. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol Dis.* 2009;33:290-300.

109. Spejo AB, JL, Goes AM, Oliveira ALR. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells on spinal motoneurons following ventral root axotomy: Synapse stability and axonal regeneration. *Neuroscience.* 2013;(10)250:715-32.

110. Alestalo K, Miettinen JA, Vuolteenaho O, Huikuri H, Lehenkari P. Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation Restores Inflammatory Balance of Cytokines after ST Segment Elevation Myocardial Infarction. *PLoS One.* 2015;10(12)e0145094.

111. Lopes-Filho JD, Caldas HC, Santos FC, Mazzer N, Simoes GF, Kawasaki-Oyama RS, Abbud-Filho M, Oliveira ALR, Toboga SR, Chueire AG. Microscopic evidences that bone marrow mononuclear cell treatment improves sciatic nerve regeneration after neurorrhaphy. *Microsc Res Tech.* 2011;74:355-63.

112. Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Suzuki Y, Taguchi A, Watanabe Y, Adachi Y, Ikehara S, Sugimoto H, Ide C. Neuroprotective effect of bone marrow-derived mononuclear cells promoting functional recovery from spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2001;24(6):1026-36.

113. de Freitas HT, da Silva VG, Giraldo-Guimarães A. Comparative study between bone marrow mononuclear fraction and mesenchymal stem cells treatment in sensorimotor recovery after focal cortical ablation in rats. *Behav Brain Funct.* 2012;13:8-58.

114. Ozdemir M, Attar A, Kuzu I, Ayten M, Ozgencil E, Bozkurt M, Dalva K, Uckan D, Kilic E, Sancak T, Kanpolat Y, Beksac M. Stem cell therapy in spinal cord injury: *in vivo* and postmortem tracking of bone marrow mononuclear or mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* 2012;8:953-62.

115. Lang EM, Asan E, Plesnila N, Hofmann GO, Sendtner M. Motoneuron survival after C7 nerve root avulsion and replantation in the adult rabbit: effects of local ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor application. 2005;115(7):2042-50

116. Barbizan R, Castro M, Ferreira Junior RS, Barraviera B, Oliveira ALR. Long-Term Spinal Ventral Root Reimplantation, but not Bone Marrow Mononuclear Cell Treatment, Positively Influences Ultrastructural Synapse Recovery and Motor Axonal Regrowth. *Int J Molecular Sciences*. 2014;15:19535-51.
117. Raheja A, Sur A, Surii A, Sarkar C, Srivastava A, Mohanty S, Jain KG, Sharma MC, Mallick HN, Yadav PK, Kaiaivani M, Pandey RM. Dose-dependent facilitation of peripheral nerve regeneration by bone marrow-derived mononuclear cells: a randomized controlled study. *J Neurosurg*. 2012;117:1170–81.
118. Kachramonoglou C, Li D, Andrews P, East C, Carlsted T, Raisman G, Choi D. Novel strategies in brachial plexus repair after traumatic avulsion. *Br. J. Neurosurg*. 2011;25:16–27.
119. Purves D, Lichtman JW. Formation and maintenance of synaptic connections in autonomic ganglia. *Physiol Rev*. 1978;58:821-62.
120. Brannstrom T, Kellerth JO. Changes in synaptology of adult cat spinal alpha-motoneurons after axotomy. *Exp Brain Res*. 1998;118:1-13.
121. Purves D. Functional and structural changes in mammalian sympathetic neurones following interruption of their axons. *J Physiol*. 1975;252:429-63.
122. Takata M, Nagahama T. Synaptic efficacy of inhibitory synapses in hypoglossal motoneurons after transection of the hypoglossal nerves. *Neuroscience*. 1983;10:23-9.
123. Delgado-Garcia JM, Del Pozo F, Spencer RF, Baker R. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat--III. Axotomized motoneurons. *Neuroscience*. 1988;24:143-60.
124. Araque A., Perea G., Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia*. 2004;47, 241-8.
125. Privat A, Valat J, Fulcrand J. Proliferation of neuroglial cell lines in the degenerating optic nerve of young rats. A radioautographic study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1981;40:46-60.
126. Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res*. 1992;17(9):877-85.
127. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res*. 2000;25:1439-51.

128. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 2001;93(3):421-43.
129. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *TINS.* 1996; 8(19):312-18.
130. Cullheim S, Thams S. The microglial networks of brain and their role in neural network plasticity after lesion. *Brain Res Rev.* 2007;55(1):89-96.
131. Colton CA. Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009;4:399–418.
132. Griffiths MR, Gasque P, Neal JW. The multiple roles of the innate immune system in the regulation of apoptosis and inflammation in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009;68:217–26.
133. Oliet SH, Piet R, Poulain DA. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science.* 2001;292:923-6.
134. Wang DD, Bordey A. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol.* 2008;86(4):342–67.
135. Koliatsos VE, Price WL, Pardo CA, Price DL. Ventral root avulsion: An experimental model for death of adult motor neurons. *J Comp Neurol.* 1994;342:35-44.
136. Schmalbruch H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *The anatomical Record.* 1986;215: 71-81.
137. Navarro X, Verdú E, Rodriguez FJ, Ceballos D. Artificial nerve graft for the repair of peripheral nerve injuries. *Neurol Sci.* 2001;22:S7–S13.
138. Wood MD, Gordon T, Kemp SWP, Liu EH, Kim H, Shoichet MS, Borschel GH. Functional Motor Recovery Is Improved Due to Local Placement of GDNF Microspheres After Delayed Nerve Repair. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(5):1272-81.
139. Brännström T, Kellerth JO. Changes in synaptology of adult cat spinal alphas motoneurons after axotomy. *Exp Brain Res.* 1998;118(1):1-13.
140. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patrício JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods.* 2001;15:108-9.
141. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N. Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação de reprodutibilidade do método entre examinadores. *Acta Ortop Bras.* 2006;14:133–6.

142. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Grambergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurol Sci.* 2000;96:77-86.
143. Kemp WP, Chiang CD, Liu EH, Wood MD, Willand MP, Gordon T, Borschel GH. Characterization of Neuronal Death and Functional Deficits following Nerve Injury during the Early Postnatal Developmental Period in Rats. *Dev Neurosci.* 2015;37:66–77.
144. Vega-Avelaira D, McKelvey R, Hathway G, Fitzgerald M. The emergence of adolescent onset pain hypersensitivity following neonatal nerve injury. *Molecular Pain.* 2012;8:30