



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

Felipe Cantore Tibúrcio

**RECONSTRUÇÃO NERVOSA VIA NEURORRAFIA ASSOCIADA
AO BIOPOLÍMERO HETERÓLOGO DE FIBRINA
Avaliação da resposta inflamatória e interação neuromuscular**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Medicina Translacional, Área de Morfologia.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

Coorientadora: Dra. Carina Guidi Pinto

**Botucatu, SP
2021**

Felipe Cantore Tibúrcio

RECONSTRUÇÃO NERVOSA VIA NEURORRAFIA
ASSOCIADA AO BIOPOLÍMERO HETERÓLOGO DE
FIBRINA

Avaliação da resposta inflamatória e interação
neuromuscular

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Medicina Translacional, Área de Morfologia.

Área de Concentração: Reparação, Regeneração e Transplante de Órgãos e Tecidos.

Área de Conhecimento: Morfologia
(2.06.00.00-3)

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus
Coorientadora: Dra. Carina Guidi Pinto

Botucatu, SP
2021

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

Tibúrcio, Felipe Cantore.

Reconstrução nervosa via neurorrafia associada ao biopolímero heterólogo de fibrina : avaliação da resposta inflamatória e interação neuromuscular / Felipe Cantore Tibúrcio. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Selma Maria Michelin Matheus

Coorientador: Carina Guidi Pinto

Capes: 20600003

1. Biopolímeros. 2. Fibrina. 3. Resposta imune.
4. Regeneração nervosa. 5. Inflamação.

Palavras-chave: Biopolímero de fibrina; Interação neuromuscular; Lesão nervosa periférica; Regeneração nervosa; Resposta imune.

Dedicatória

***A todos os indivíduos acometidos
por lesões traumáticas de nervo
periférico.***

*Que a Ciência um dia encontre um
tratamento que garanta a recuperação
e a qualidade de vida desses
pacientes.*

*"O que sabemos é uma gota, o que
ignoramos é um oceano" (Sir Isaac Newton).*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ser meu refúgio e minha fortaleza e por me guiar nesta jornada.

*"Porquanto tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei...
estarei com ele na angústia; dela o retirarei, e o glorificarei."*

A minha **família**, pais, avós, tias, primas... por todo o amor, carinho e união, que estejamos sempre juntos pro que der e vier.

Em especial a minha **mãe Rosemeire** e minha **vó Neuza** por sempre estarem ao meu lado, me apoiarem, confiarem e acreditarem em mim.

A minha orientadora **Profa. Dra. Selma M. M. Matheus**, por ser uma orientadora excepcional, apaixonada pelo que faz, um exemplo pessoal e profissional no qual eu me espelho. Por todas as oportunidades, aprendizados, conhecimento e experiência compartilhados, pela confiança e dedicação, e por despertar ainda mais o meu amor pelo estudo e ensino da Anatomia.

A minha coorientadora e amiga **Dra. Carina Guidi**, por toda ajuda na realização das cirurgias e coletas que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho. Por todo apoio e ensinamentos, amizade, carinho e dedicação, e por todas as risadas e momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório **Kevin, Igor, Gabriel e Maria Antônia**, que foram meus ICs e me auxiliaram muito na realização deste trabalho, sem vocês eu não teria conseguido, muito obrigado.

Em especial a **Ana Paula**, minha grande amiga e a melhor parceira de laboratório que eu poderia ter. Por toda experiência e conhecimento compartilhados, por toda ajuda, dedicação, apoio e companheirismo vivido no dia a dia.

Ao **Jorge**, meu companheiro de todos os momentos, por estar sempre comigo nas alegrias e tristezas, na saúde e na doença. Por toda convivência, apoio e dedicação. Por sempre me ajudar e me aguentar, e por fazer os meus dias e a minha vida mais feliz.

A minha amiga **Thamiris**, que passou de amiga, a vizinha, a colega de casa, e agora é uma das saudades que Botucatu nos deixa. Obrigado por todo companheirismo e apoio, pelos momentos divertidos, conversas e risadas que tivemos.

Aos meus **amigos**, mesmo que distantes; a maioria cuja amizade trouxe da Graduação, amizades especiais que começaram em Botucatu e vou levar para a vida toda.

Aos **Profs. Drs. Renato Ferretti, Camila Francia, Raquel Domeniconi e Claudia Pellizzon**, por terem me dado à oportunidade de realizar Estágio de Docência, Aprimoramento Didático e Programa de Aprendizagem. Que me permitiram uma maior aproximação com a prática docente e o processo ensino-aprendizagem nas áreas de Anatomia Humana e Comparada e Histologia.

Aos **Profs. Drs. José de Anchieta e Pedro Hamamoto**, pela participação em minhas Bancas de Acompanhamento que permitiram melhorar este trabalho.

Aos alunos, docentes e técnicos do **Setor de Anatomia** do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do IBB/Unesp, por todo auxílio, companheirismo, incentivo e amizade.

Em especial ao **Gelson** pelo auxílio na realização das técnicas histológicas.

Ao **CEVAP** da Unesp de Botucatu, pela colaboração científica e por ceder o biopolímero de fibrina para a realização deste trabalho.

Ao Programa de **Pós-Graduação em Cirurgia e Medicina Translacional** da FMB/Unesp, que me permitiu realizar este Mestrado.

Em especial a **Márcia Fonseca Piagentini Cruz**, secretária do Programa, por todo auxílio burocrático e por estar sempre pronta a nos atender e ajudar.

A **Unipex** da FMB/Unesp e seus servidores, pela estrutura e auxílio físico e instrumental, que foram indispensáveis para realização deste estudo.

Em especial aos técnicos do Laboratório de Cirurgia Experimental, **Zé e Bardella**; aos bioteristas, **Robson e Sílvio**; ao **Diego**, veterinário responsável; e aos técnicos do Laboratório de Histotecnologia, **Leandro e Denise**.

As agências de fomento **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado, e a **CNPq**, pela bolsa de iniciação científica/PIBIC vinculada a este estudo.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani**, pelo auxílio com todas as análises estatísticas.

Ao **Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega** e suas alunas **Beatriz** e **Maira**, e a **Profa. Dra. Mirela Barros Dias** e seus alunos **Laisa** e **Bruno** pela disponibilidade e auxílio no uso dos equipamentos.

Aos membros da minha banca de qualificação, **Profs. Drs. Cintia Matsumura** e **André Bombeiro**, pelas muitas contribuições que ajudaram a melhorar este trabalho.

E aos membros da minha banca de defesa, **Profas. Dras. Adriana Pertille** e **Cintia Matsumura** pela disponibilidade e por terem aceitado este convite.

Aos **animais** que doaram suas vidas involuntariamente para a realização deste trabalho.

“Ao cadáver que, jacente na fria lousa do laboratório, me permitiu aprender Anatomia”.

(Prof. Tit. Valdemar de Freitas, 2004.)

Muito obrigado!

Epígrafe

"Seu nome só Deus o sabe; mas o destino inexorável deu-lhe o poder e a grandeza de servir a humanidade que por ele passou indiferente."

Karl Rokitansky, 1876.

Resumo

As lesões nervosas periféricas (LNPs) afetam, além do nervo, a inervação do músculo e as junções neuromusculares (JNMs) associadas. Ocorrem diversas alterações morfofuncionais e moleculares, além de uma intensa resposta imune, principalmente macrofágica. Métodos alternativos de reparo vêm sendo utilizados a fim de potencializar a regeneração nervosa como o biopolímero heterólogo de fibrina (BHF). O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do BHF associado à neurorrafia no reparo do nervo isquiático, com ênfase no microambiente da lesão e na interação neuromuscular. Quarenta ratos Wistar (CEUA/IBB/Unesp: 1177/2019) foram distribuídos em 4 grupos (n = 10/grupo). No grupo Controle (C) foi realizada a localização do nervo. No grupo Desnervado (D), neurotmeze e remoção de fragmento de 6 mm, inversão dos cotos e fixação na tela subcutânea. No grupo Sutura (S), neurotmeze seguida de neurorrafia. No grupo Sutura + BHF (SB), neurotmeze seguida de neurorrafia e acrescido o BHF. Os animais foram eutanasiados aos 7 e 30 dias após cirurgia. Os nervos e os músculos sóleos foram coletados para análise semiquantitativa dos macrófagos M2 (CD206+); análise morfológica e morfométrica do nervo, do músculo e das JNMs; quantificação de tecido conjuntivo intramuscular. O grupo SB foi o único que apresentou semelhança ou maior proximidade ao grupo C, em relação ao número de axônios aos 7 dias; e ao número, área e densidade dos vasos sanguíneos, angulação e ângulo de Feret das JNMs, número de núcleos centrais e quantificação de tecido conjuntivo do músculo, aos 30 dias. Também aos 7 dias no grupo SB, houve aumento da área do nervo, número e área dos vasos sanguíneos em relação aos outros grupos. E ainda no grupo SB aos 7 e 30 dias houve aumento da área dos macrófagos M2 em relação a todos os outros grupos. Esses resultados demonstram o potencial do BHF em acelerar a regeneração nervosa, induzir angiogênese e potencializar a resposta imune, além de prevenir degeneração muscular severa, com menor grau de fibrose e auxiliar no retorno das JNMs aos seus padrões morfológicos normais. O BHF fornece um microambiente favorável, que melhora a regeneração nervosa, e assim, vantajoso no reparo de nervos periféricos.

Palavras-chave: Biopolímero de fibrina; Interação neuromuscular; Lesão nervosa periférica; Macrófagos; Neurorrafia; Regeneração nervosa; Resposta imune.

Abstract

Peripheral nerve injuries (PNIs) affect, in addition to the nerve, muscle innervation and associated neuromuscular junctions (NMJs). There are several morphofunctional and molecular changes, in addition to an intense immune response, mainly macrophagic. Alternative repair methods have been used in order to enhance nerve regeneration, such as the heterologous fibrin biopolymer (HFB). The purpose of this study was to evaluate the effects of HFB associated with neurorrhaphy on sciatic nerve repair, with emphasis on the microenvironment of the injury and on neuromuscular interaction. Forty Wistar rats (CEUA/IBB/Unesp: 1177/2019) were distributed into 4 groups (n = 10/group). In the Control group (C), the location of the nerve was performed. In the Denervated group (D), neurotmesis and removal of a 6 mm fragment, inversion of the stumps and fixation in the subcutaneous tissue. In the Suture (S) group, neurotmesis followed by neurorrhaphy. In the Suture + BHF (SB) group, neurotmesis followed by neurorrhaphy plus BHF. Animals were euthanized at 7 and 30 days after surgery. The nerves and soleus muscles were collected for semiquantitative analysis of macrophages M2 (CD206+); morphological and morphometric analysis of the nerve, muscle and NMJs; quantification of intramuscular connective tissue. Group SB was the only one that showed similarity or greater proximity to group C, in relation to the number of axons at 7 days; and the number, area and density of blood vessels, angulation and Feret angle of NMJs, number of central nuclei and quantification of muscle connective tissue, at 30 days. Also at 7 days in the SB group, there was an increase in the nerve area, number and area of blood vessels in relation to the other groups. And even in the SB group at 7 and 30 days there was an increase in the area of M2 macrophages compared to all other groups. These results demonstrate the potential of BHF in accelerating nerve regeneration, inducing angiogenesis and potentiating the immune response, in addition to preventing severe muscle degeneration with a lower degree of fibrosis and helping to return NMJs to their normal morphological patterns, which improves nerve regeneration, and thus is advantageous in peripheral nerve repair.

Keywords: Fibrin biopolymer; Immune response; Macrophages; Neuromuscular interaction; Neurorrhaphy; Nerve regeneration; Peripheral nerve injury.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Esquema geral de um neurônio e seus componentes celulares.

Figura 2 – Fotomicrografia de secção transversal de nervo isquiático corado com tetróxido de ósmio e azul de toluidina e representação esquemática de um nervo espinal em corte transversal. A: Epineuro. B: Perineuro. C: Endoneuro. D: Bainha de mielina.

Figura 3 – Representação da inervação do músculo estriado esquelético. Desde a origem do neurônio motor inferior na coluna anterior da medula espinal até sua inervação propriamente dita ao se conectar com a fibra muscular, formando a junção neuromuscular.

Figura 4 – Representação de uma junção neuromuscular seus componentes e compartimentos. Membranas pré- e pós-sináptica e fenda sináptica.

Figura 5 – Esquema das classificações das lesões nervosas periféricas representando os graus de dano ao nervo e seus componentes afetados. Classificação de Seddon (neuropraxia, axonotmese e neurotmese) e de Sunderland (1 a 5).

Figura 6 – Representação esquemática da degeneração Walleriana. Detalhe para a fragmentação do axônio e bainhas de mielina e presença de macrófagos na extremidade distal do axônio.

Figura 7 – Divisão fenotípica dos macrófagos M1 e M2 e suas respectivas vias de atuação.

Figura 8 – Embalagem e frascos do biopolímero heterólogo de fibrina. A: Embalagem (contendo o nome antigo “Selante de Fibrina”). B: Frascos contendo as Frações I, II e diluente.

Figura 9 – Atividade coagulante da gioxina (serino-protease). A e b: Coágulo de fibrina formado após diluição de fibrinogênio com gioxina, mimetizando o BHF. Seta: Detalhe da rede de fibrina.

Figura 10 – Representação esquemática do trajeto e localização anatômica do nervo isquiático em modelo de rato Wistar, posicionado em decúbito ventral com vista da região caudal do membro pélvico após tricotomia. Observa-se sua

ramificação (trifurcação), próxima à altura da fossa poplítea, dando origem aos nervos (lateral para medial) fibular comum, tibial e sural. Detalhe do trocânter maior do fêmur, marco anatômico característico para correta localização do nervo isquiático.

Figura 11 – Fotografias das técnicas cirúrgicas realizadas em todos os grupos experimentais. A e B: Incisão. C: Localização do nervo isquiático (grupo C). D: Neurotmese, inversão e fixação dos cotos proximal e distal (grupo D). E: Detalhe da neurorrafia (grupo S). F: Detalhe da neurorrafia associada ao BHF (grupo SB). Asterisco (*): rede de fibrina formada pelo BHF.

Lista de abreviaturas e siglas

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ANOVA – Análise de variância

BHF – Biopolímero heterólogo de fibrina

C – Grupo Controle

CD – Cluster de diferenciação / grupamento de diferenciação

CD206 – Cluster de diferenciação 206 / Receptor de manose

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CEVAP – Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos

D – Grupo Desnervado

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

FMB – Faculdade de Medicina de Botucatu

HE – Hematoxilina e eosina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IBB – Instituto de Biociências de Botucatu

IFN- γ – Interferon- γ

IL – Interleucina

IROs – Intermediários reativos de oxigênio

JNM – Junção neuromuscular

LNP – Lesão nervosa periférica

LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano

M1 – Macrófagos M1

M2 – Macrófagos M2

MANOVA – Análise de variância multivariada

nAChRs – Receptores nicotínicos de acetilcolina

NGF – Fator de crescimento nervoso

O.C.T – Temperatura ótima de corte

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PBS – Tampão fosfato salino

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

S – Grupo Sutura

SB – Grupo Sutura + Biopolímero de fibrina

SN – Sistema nervoso

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

TLR – Receptor do tipo Toll

TM – Tricrômico de masson

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Unipex – Unidade de Pesquisa Experimental

v – Versão

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de símbolos

% – Porcentagem

® – Marca registrada

h – Horas

HCl – Ácido clorídrico

kg – Kilogramas

m – Metro

M – Molar / mol por litro

mg – Miligramas

min – Minutos

mL – Mililitros

mm – Milímetros

NO – Óxido nítrico

°C – Graus Celsius

p – Probabilidade de significância

pH – Potencial hidrogeniônico

SP – São Paulo

x – Vezes

α – Alfa

γ – Gama

μL – Microlitros

μm – Micrômetros

Sumário

Introdução	17
Justificativa	39
Objetivo	41
Material e métodos	43
Referências	52
Capítulo I (Artigo)	59
Resumo	61
Introdução	62
Material e métodos	64
Resultados	68
Discussão	82
Referências	87
Anexo (Certificado CEUA)	90

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA NERVOSO: CONSTITUIÇÃO GERAL E DIVISÃO ANATÔMICA

O sistema nervoso (SN) pode ser dividido anatomicamente em duas partes: uma parte central, o sistema nervoso central (SNC), e uma parte periférica, o sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é constituído pelo encéfalo e pela medula espinal, enquanto que os nervos, gânglios e terminações nervosas compõem o SNP (Felten *et al.*, 2015; Bear *et al.*, 2020).

O SN é constituído pelo tecido nervoso, uma complexa rede de células altamente especializadas que transmitem sinais elétricos (impulsos nervosos) de e para as diferentes regiões do corpo, coordenando assim todas as suas funções (Hussain *et al.*, 2020).

As células que compõem o tecido nervoso são divididas em dois grupos: neurônios e células da glia. As células da glia incluem, no SNC, oligodendrócitos, astrócitos, micróglia e células ependimárias, e no SNP, células de Schwann e células satélites (anfícitos). Os neurônios são responsáveis pela recepção, transmissão e processamento de estímulos, por meio da geração e condução de impulsos nervosos, enquanto que as células da glia possuem papel de sustentação, defesa e nutrição dos neurônios, fornecendo-os um microambiente adequado (Felten *et al.*, 2015; Bear *et al.*, 2020).

Um neurônio (Figura 1) é constituído por um corpo celular, do qual tem origem os dendritos e o axônio. O corpo celular contém organelas responsáveis pela síntese de macromoléculas e de outros componentes necessários para garantir a estrutura e função do neurônio. Os dendritos são inúmeras ramificações que partem do corpo celular, e realizam diversas sinapses, constituindo a principal área de contato e comunicação dos neurônios. O axônio também tem origem no corpo celular, em uma região denominada cone de implantação, mas diferente dos dendritos, é uma ramificação geralmente única, que se estende por longas distâncias, podendo chegar a mais de 1 m de comprimento (Bear *et al.*, 2020).

Todos os axônios têm um começo (cone de implantação ou cone axônico), um meio (o axônio propriamente dito) e um fim. A extremidade final é denominada terminal nervoso ou botão terminal (Figura 1), é um local onde o axônio entra em

contato com outros neurônios ou outras células, e transmite informações a elas, constituindo as sinapses axônicas (Bear *et al.*, 2020).

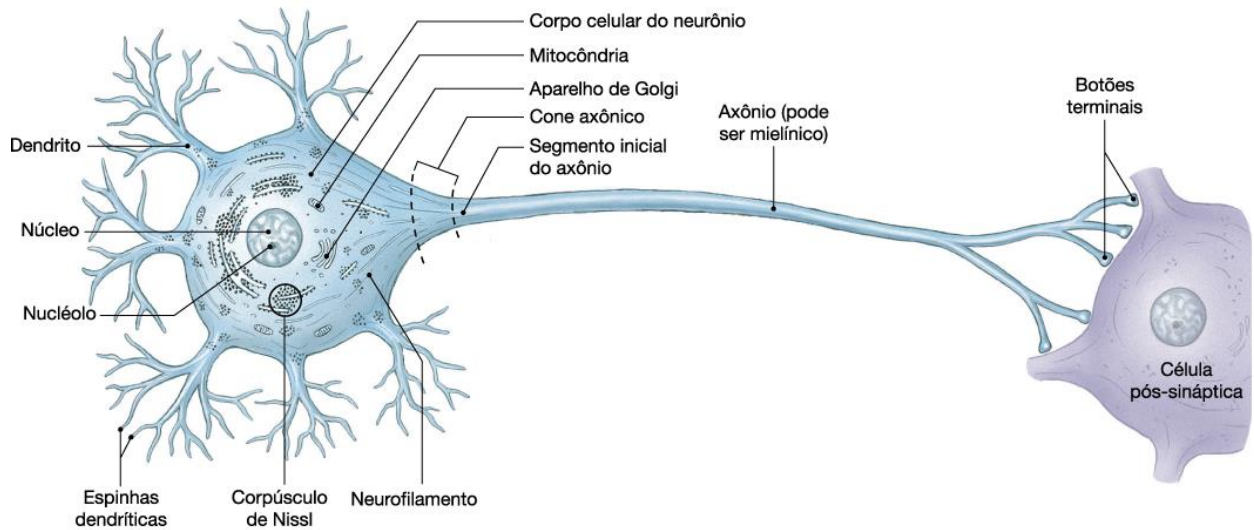


Figura 1: Esquema geral de um neurônio e seus componentes celulares. Adaptado de Martini *et al.* (2009).

Os axônios podem associar-se, no SNP, a células de Schwann, e no SNC, a oligodendrócitos, que emitem projeções da sua membrana plasmática, envolvendo os axônios, e formando as bainhas de mielina. Enquanto um oligodendrócito contribui com mielina para vários axônios, cada célula de Schwann mieliniza apenas um único axônio. A bainha de mielina não se estende continuamente ao longo de todo o comprimento do axônio, há espaços sem mielinização entre as bainhas, chamados de nodos de Ranvier. A distância entre os nodos é geralmente de 0,2 a 2,0 μm , dependendo o tamanho do axônio, sendo que axônios de maior diâmetro possuem distâncias internodais maiores. A mielina associada ao axônio tem como função o isolamento elétrico, visando o aumento da velocidade de condução do impulso nervoso. Os axônios mais o seu envoltório glial são denominados de fibras nervosas, que podem ser mielinizadas ou não (Bear *et al.*, 2020).

O diâmetro de um axônio varia de menos de 1 μm a cerca de 25 μm em humanos. Esta variação é importante, logo que a velocidade de condução do impulso nervoso aumenta com o aumento do diâmetro axonal. Axônios de grande e médio diâmetro (maiores que 1 μm) apresentam bainhas de mielina, enquanto que

os axônios de pequeno diâmetro (menores que 1 μm) são desmielinizados (Felten *et al.*, 2015; Bear *et al.*, 2020).

1.2. SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO: ESTRUTURA E FUNÇÃO

Os nervos são os principais constituintes do SNP, são formados por feixes de fibras nervosas, e associam diferentes partes do corpo ao SNC. Os sinais sensoriais são transmitidos ao SNC por meio das fibras nervosas sensitivas (aférentes), e a resposta gerada é conduzida pelas fibras nervosas motoras (eferentes) até os órgãos-alvo. Assim, uma via de comunicação mútua é estabelecida entre o SNC e áreas periféricas do corpo (Hussain *et al.*, 2020).

Morfologicamente, cada nervo é constituído externamente pelo epineuro (Figura 2A.), uma camada fibrosa de tecido conjuntivo denso que reveste o nervo e envolve os feixes de fibras nervosas, denominados de fascículos nervosos, conferindo resistência e rigidez a estrutura. O epineuro possui um arranjo mais espaçado de fibras colágenas, e ainda inclui tecido adiposo, além de ser vascularizado por capilares fenestrados, ou seja, que possuem orifícios (fenestras) em sua camada de células endoteliais. Cada fascículo nervoso é revestido pelo perineuro (Figura 2B), formado por várias camadas de células robustas, achatadas e justapostas (células perineurais), unidas por junções oclusivas e interpostas por lâmina basal. O perineuro é permeado por pequenos vasos sanguíneos, que irrigam o tecido nervoso, denominados de *vasa nervorum* ou vaso dos nervos, cujas células endoteliais são unidas por junções oclusivas, sendo que o perineuro é uma das camadas que constitui a barreira hematoneural (ou hematoneurótica), uma barreira que previne passagem de muitas macromoléculas, sendo um importante mecanismo de defesa contra agentes nocivos. Dentro de cada fascículo encontram-se axônios, cada um envolvido pelas células de Schwann, com sua lâmina basal, e um envoltório de tecido conjuntivo frouxo, o endoneuro (Figura 2C), constituído principalmente por células endoneurais, fibras colágenas, fibras reticulares sintetizadas pelas células de Schwann, além de outros elementos da matriz extracelular. O endoneuro é permeado por capilares sanguíneos que provêm dos *vasa nervorum*, e com isso, suas células endoteliais também formam junções oclusivas impermeáveis, estabelecendo efetivamente a barreira hematoneural (Kerns, 2008; Geuna *et al.*, 2009).

Como já mencionado anteriormente, na maioria das fibras nervosas do SNP, a membrana plasmática da célula de Schwann se enrola em volta do axônio, fundindo-se, e dando origem à bainha de mielina (Figura 2D), um complexo lipoproteico constituído por diversas camadas de membrana celular modificada, possuindo maior proporção de lipídeos do que as membranas celulares em geral. Essa bainha se interrompe em intervalos regulares formando os nodos de Ranvier, recobertos por expansões laterais das células de Schwann, que vão garantir a condição saltatória dos sinais elétricos, aumentando a velocidade de condução do impulso nervoso (Geuna *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2020).

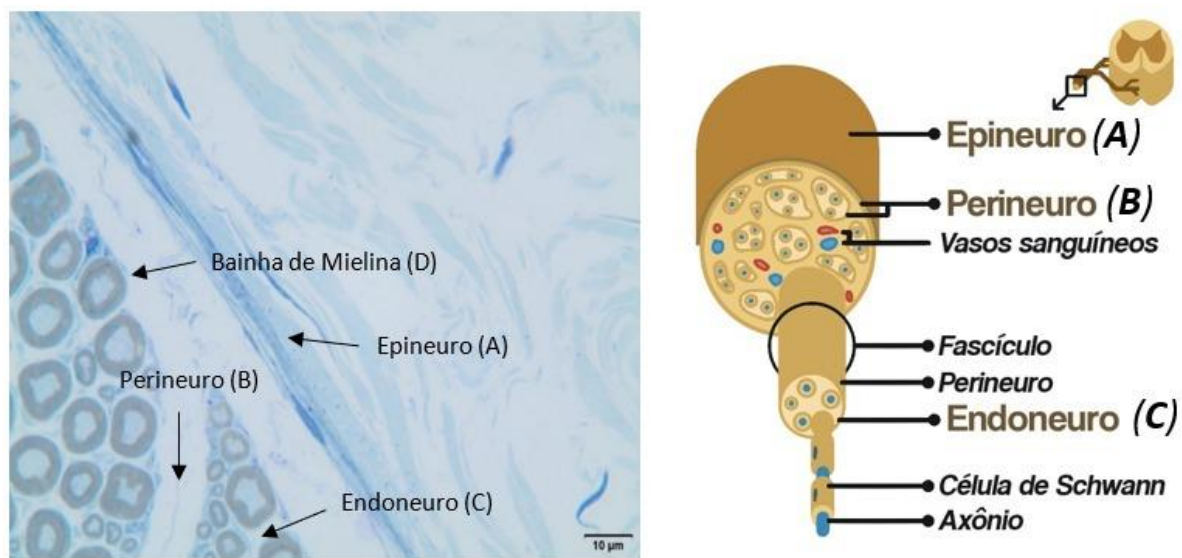


Figura 2: Fotomicrografia de secção transversal de nervo isquiático corado com tetróxido de ósmio e azul de toluidina e representação esquemática de um nervo espinal em corte transversal. **A:** Epineuro. **B:** Perineuro. **C:** Endoneuro. **D:** Bainha de mielina.

Os nervos podem ser classificados anatomicamente, de acordo com a sua origem, em cranianos e espinais, e funcionalmente em sensitivos, motores e mistos. Nervos espinais, originados na medula espinal, são todos mistos, ou seja, formados por fibras nervosas sensitivas e motoras (Waldram, 2003; Hussain *et al.*, 2020). Os axônios dos nervos espinais são projeções de neurônios, cujos corpos celulares, das fibras nervosas sensitivas, estão localizados nos gânglios sensitivos das raízes posteriores (dorsais), e das fibras nervosas motoras, na coluna anterior da medula espinal (Figura 3), para função motora somática, e na coluna lateral, para função motora visceral (sistema nervoso autônomo) (Felten *et al.*, 2015; Bear *et al.*, 2020).

Entre as fibras nervosas motoras temos o neurônio motor inferior (Figura 3), uma célula especializada e com uma arborização dendrítica altamente desenvolvida. Esse neurônio consiste em um dos principais pontos de conexão do SNC com o SNP, e ao alcançar seu órgão-alvo, o músculo estriado esquelético, forma uma região morfofuncionalmente especializada denominada de junção neuromuscular (JNM) (Figura 3). Neste local, ocorre a transmissão e a transdução de um sinal elétrico (impulso nervoso) e químico (neurotransmissores) do neurônio motor para a fibra muscular, promovendo a contração muscular. Essa junção apresenta uma subclasse principal de sinapse no sistema nervoso dos mamíferos, crítica para a transferência de informações entre o sistema nervoso (neurônio motor inferior) e o músculo esquelético. Também representa uma sinapse "modelo" convenientemente acessível dentro do sistema nervoso periférico (Jones *et al.*, 2017).

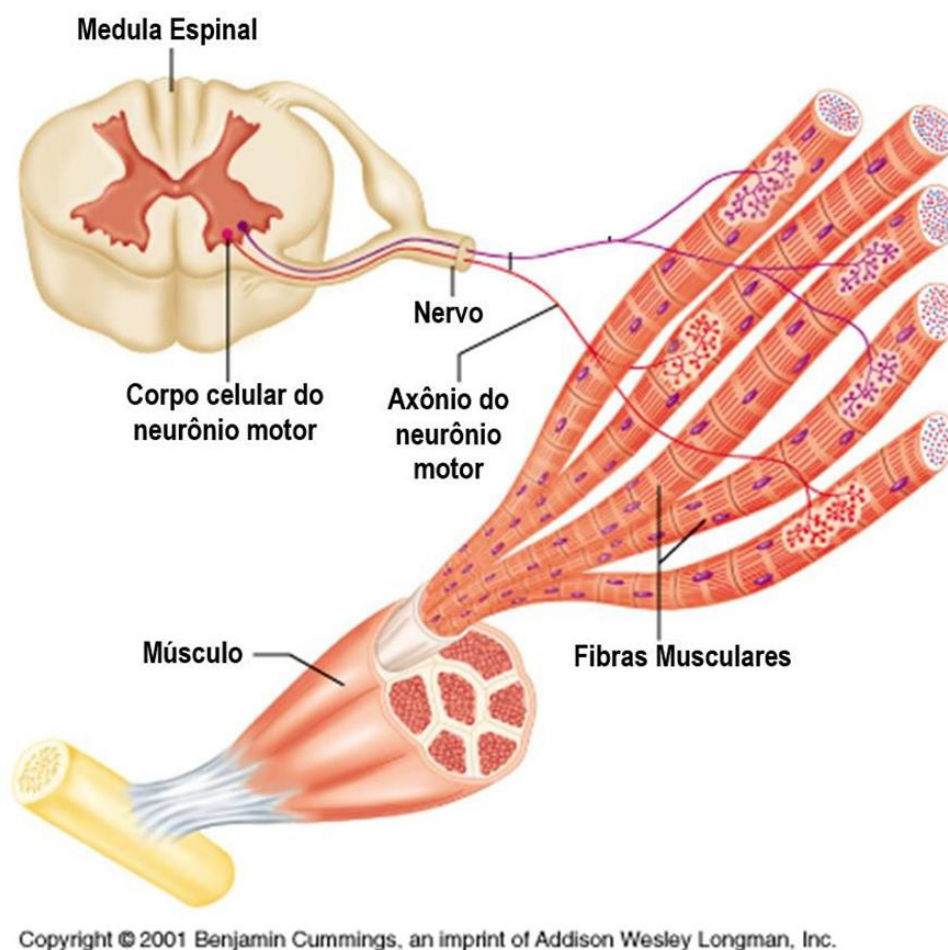


Figura 3: Representação da inervação do músculo estriado esquelético. Desde a origem do neurônio motor inferior na coluna anterior da medula espinal até sua inervação propriamente dita ao se conectar com a fibra muscular, formando a junção neuromuscular.

Morfologicamente, as JNMs são formadas por três compartimentos (Figura 4): o compartimento pré-sináptico, onde estão presentes o terminal nervoso do neurônio motor inferior, com as vesículas sinápticas contendo o neurotransmissor acetilcolina (ACh), e as células de Schwann terminais, específicas desta região; o compartimento extracelular ou fenda sináptica, preenchido pela lâmina basal, estando presente a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela degradação da acetilcolina após a contração muscular; e o compartimento pós-sináptico, que compreende a membrana plasmática da fibra muscular (sarcolema) com as dobras juncionais, onde se encontram os receptores de acetilcolina (nAChRs) e diversas proteínas associadas e o citoplasma da fibra muscular (sarcoplasma) que proporciona um suporte estrutural e metabólico para a região pós-sináptica (Malomouzh, 2012; Tintignac *et al.*, 2015).

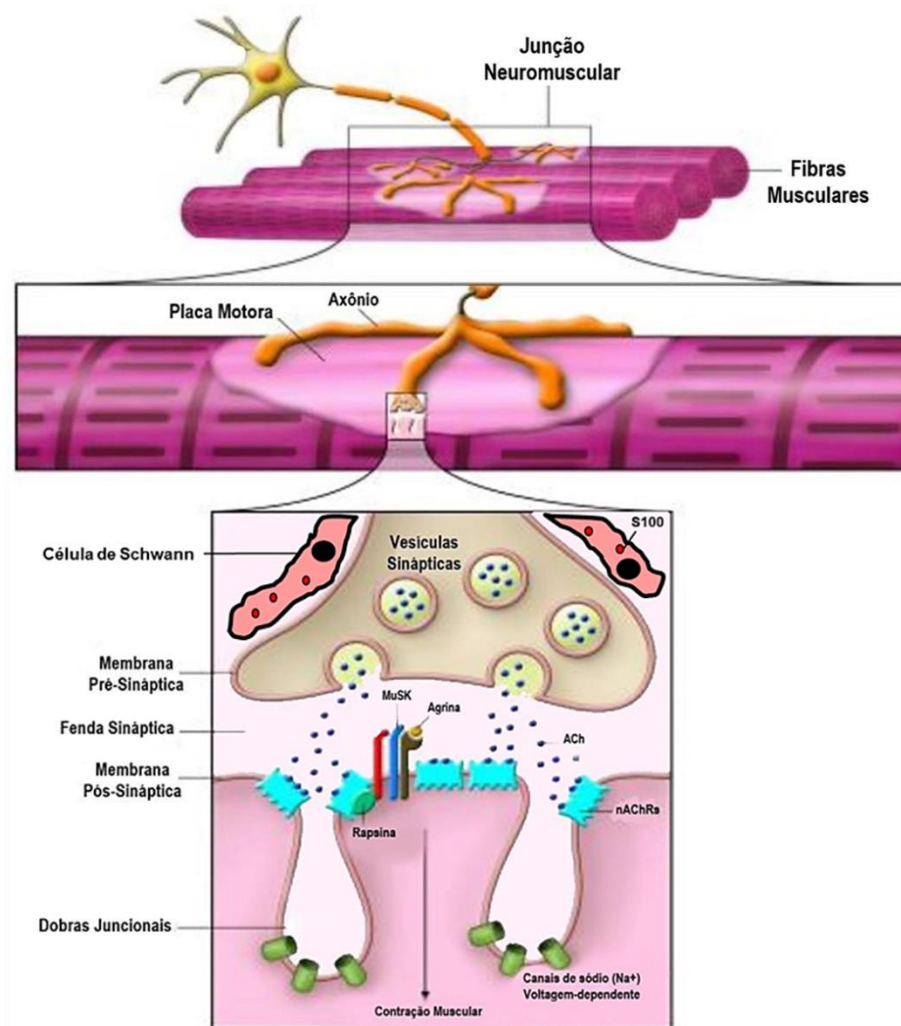


Figura 4: Representação de uma junção neuromuscular seus componentes e compartimentos. Membranas pré- e pós-sináptica e fenda sináptica. Adaptado de Conti-Fine *et al.* (2006)

1.3. LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA: CONCEITOS, EPIDEMIOLOGIA, CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

De modo geral, os nervos são estruturas frágeis e delicadas, propensos a serem danificados por traumas, como esmagamento e compressão, que causam a interrupção da condução nervosa, e representam um obstáculo na comunicação do SNC com os órgãos-alvo (Hussain *et al.*, 2020).

As lesões nervosas periféricas (LNPs) são consideradas um quadro clínico comum (Jones *et al.*, 2016), afetando, entre os anos de 1998 e 2006, somente na Suíça, cerca de 14 pessoas a cada 100 mil anualmente (Asplund *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos, entre 2009 e 2018, 551.612 mil pacientes apresentaram LNP, uma taxa de incidência geral (média) de cerca de 37 a cada 1 milhão de pessoas por ano. Essas taxas de incidência aumentaram significativamente durante este período, de cerca de 22 a cada 1 milhão de pessoas por ano em 2009, para cerca de 52 a cada 1 milhão de pessoas/ano em 2018, sendo que os homens apresentaram maior taxa que as mulheres, bem como indivíduos entre 30 e 40 anos foram mais afetados (Li *et al.*, 2020).

Em todo o mundo, estima-se que cerca de 2% a 3% dos pacientes admitidos em centros de trauma apresentam LNP, e essa porcentagem é maior se as lesões de plexo e raízes nervosas forem incluídas. Como as LNPs podem ser acompanhadas por traumas do SNC, sua identificação inicial também permanece problemática. Isso é exemplificado pelo fato de que 10% a 34% dos pacientes com lesão cerebral traumática, atendidos em unidades de reabilitação, apresentam LNPs associadas. As LNPs mais frequentemente são as lesões do plexo braquial e dos nervos: ulnar, mediano, radial, fibular e isquiático (Kouyoumdjian *et al.*, 2017).

As causas mais comuns de LNPs são: acidentes automobilísticos, traumas por arma de fogo e arma branca, e lacerações com materiais perfurocortantes (Robinson, 2000; Waldram, 2003). No Brasil, os acidentes de trânsito são as causas mais comuns (46,4% dos casos), afetando principalmente o plexo braquial e os nervos radial, fibular e isquiático. Sendo que, lesões de plexo braquial foram consideravelmente mais comuns em acidentes envolvendo motocicletas (46,1%), do que envolvendo carros (17,1%). Os traumas penetrantes após perfurações ocupam o segundo lugar (23,9% dos casos), e comumente acometem os nervos ulnar e mediano. Quedas e ferimentos por arma de fogo, frequentemente afetam os nervos

ulnar, radial e mediano. Lesões esportivas, principalmente relacionadas ao futebol, afetam predominantemente o nervo fibular (Kouyoumdjian *et al.*, 2017).

As LNPs podem resultar em comprometimentos sensoriais e motores, atrofia, encurtamentos musculares, retrações teciduais, edema, áreas com diminuição da sensibilidade, limitações funcionais, dor crônica, entre outros (Stafford *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 2016). Também podem afetar o comportamento, a mobilidade, a percepção, as sensações, e resultar em incapacidades para o resto da vida (Hussain *et al.*, 2020).

1.4. CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS

As LNPs são classificadas em diferentes graus, dependendo da gravidade das mesmas. Estas classificações ajudam cientistas e médicos a discutir efetivamente a fisiopatologia da lesão nervosa e determinar o tratamento apropriado, pois permitem a correlação entre as alterações microscópicas do nervo e a sintomatologia do paciente (Burnett e Zager, 2004; Hussain *et al.*, 2020).

Herbert Seddon classificou as LNPs em 3 graus, com base na presença de desmielinização e na dimensão do dano aos axônios e aos envoltórios conjuntivos do nervo, enquanto que Sydney Sunderland deu uma subdivisão adicional à classificação de Seddon, com base na descontinuidade das várias camadas dos envoltórios conjuntivos no nervo (Hussain *et al.*, 2020).

A classificação de Seddon (1943) consiste em 3 graus ou categorias: neuropraxia, axonotmese e neurotmese (Figura 5). A neuropraxia é o tipo de lesão mais branda, normalmente causada pelo leve esmagamento ou compressão das fibras nervosas. É caracterizada pela interrupção da condução nervosa por uma lesão na bainha de mielina, sem haver descontinuidade axonal. Há perda funcional transitória e normalmente apresenta recuperação rápida e completa. Na axonotmese ocorre a interrupção da condução nervosa devido a uma perda parcial na continuidade do axônio, seguida do processo de degeneração Walleriana distalmente ao ponto da lesão. Nestes casos a recuperação funcional depende do crescimento axonal, e ocorre mais comumente associada às lesões por esmagamento e fraturas ósseas. Os envoltórios de tecido conjuntivo, perineuro e o epineuro, permanecem preservados. Por isso, a perspectiva de recuperação é boa, mas, ainda assim, a recuperação total é menos provável do que na neuropraxia. Já

na neurotmele, ocorre o bloqueio da condução nervosa devido à transecção completa do nervo. Não apresenta recuperação funcional espontânea, tornando-se necessária uma intervenção cirúrgica, sendo assim considerada a forma mais grave de lesão nervosa (Hussain *et al.*, 2020).

Sunderland (1951) expandiu a classificação de Seddon para 5 graus (Figura 5), a fim de distinguir a dimensão do dano nos envoltórios conjuntivos. À neuropraxia foi atribuído o grau 1, ao passo que a axonotmele foi dividida em três graus. O grau 2 indica o dano no qual o axônio e a bainha de mielina se desconectam, mas a continuidade dos envoltórios conjuntivos permanece conservada. Isso leva à desnervação dos órgãos-alvo e causa o distúrbio das funções sensoriais e motoras. Esse tipo de lesão não requer qualquer intervenção cirúrgica. A recuperação funcional completa pode levar de várias semanas a vários meses para acontecer, uma vez que a regeneração axonal é essencial. No dano de grau 3, o axônio e a bainha de mielina se desconectam junto ao endoneuro, enquanto os outros envoltórios permanecem intactos, e a recuperação funcional é mais difícil. Na lesão de grau 4, há apenas continuidade do epineuro, enquanto os outros envoltórios (endoneuro e perineuro) e a bainha de mielina se desconectam, sendo assim, um dano mais severo. O principal exemplo deste tipo de lesão é o esmagamento do nervo. Por fim, a lesão de grau 5 é análoga à neurotmele. Em algumas situações, o termo lesão de grau 6 pode ser utilizado para intitular uma lesão mista, como devido a um tiro, ferimento apunhalado ou tração fechada, que provocam lesões parciais dos nervos, denominado de “neuroma em continuidade”. Isso representa uma mistura de qualquer um dos cinco graus de lesão de Sunderland, descritos anteriormente, e é o maior desafio para os cirurgiões (Hussain *et al.*, 2020).

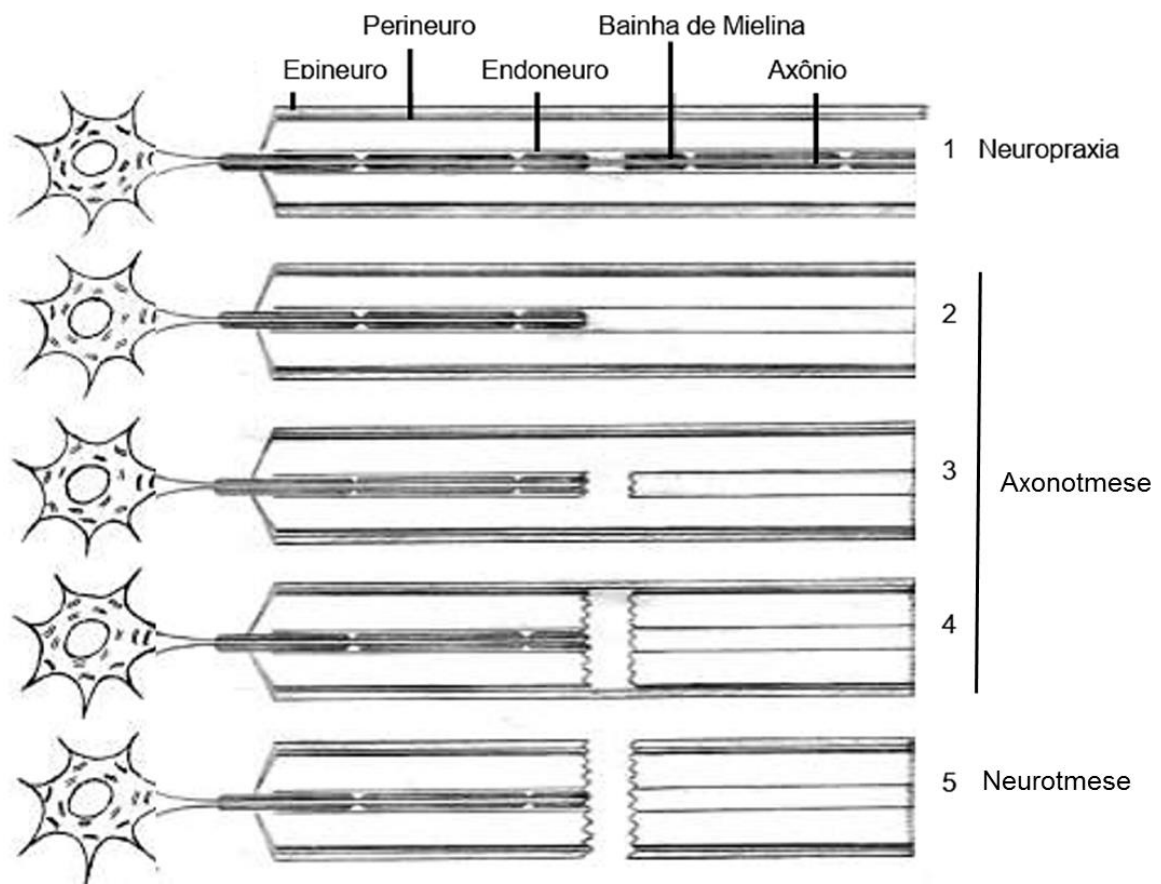


Figura 5: Esquema das classificações das lesões nervosas periféricas representando os graus de dano ao nervo e seus componentes afetados. Classificação de Seddon (neuropraxia, axonotmese e neurotmese) e de Sunderland (1 a 5). Adaptado de Colli e Carlotti Júnior (1993).

1.5. FISIOPATOLOGIA DA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Após uma LNP, uma série de processos degenerativos ocorre antes que haja a regeneração das fibras nervosas. O sucesso da regeneração depende, em grande parte, da gravidade da lesão e das mudanças degenerativas resultantes (Burnett e Zager, 2004).

O processo de degeneração do nervo lesionado, denominado degeneração Walleriana (Figura 6), consiste na fragmentação e desintegração física da parte distal dos axônios e das bainhas de mielina (Hussain *et al.*, 2020).

As células de Schwann desempenham um papel fundamental na degeneração Walleriana, auxiliando tanto nos processos de degeneração, quanto de regeneração. O papel inicial dessas células é auxiliar na remoção dos detritos axonais e mielínicos degenerados e depois conduzi-los aos macrófagos (Figura 6)

(Burnett e Zager, 2004). Após a lesão nervosa, a bainha de mielina fragmenta-se, sendo que seu contato com o axônio é essencial para garantir a manutenção do mesmo. As células de Schwann mielinizantes liberam sua mielina, proliferam-se, produzem citocinas e fatores tróficos e realizam a autofagia dos restos mielínicos e de axônios degenerados. Os fatores solúveis produzidos pelas células de Schwann e pelos axônios lesionados ativam macrófagos teciduais residentes e atraem macrófagos derivados de monócitos, provenientes da circulação sanguínea, para o microambiente da lesão (Gaudet *et al.*, 2011).

A presença de macrófagos no segmento distal do nervo lesionado pode ser observada a partir de 3 dias após lesão, período no qual ocorre o influxo dessas células, havendo pico em torno de 14 dias, e uma quantidade baixa dessas células, mas ainda presente no microambiente de lesão após 8 semanas. Embora essa presença de macrófagos seja maior na parte distal do nervo (Figura 6), ocorre ainda um menor acúmulo dessas células no coto nervoso proximal (Zigmond e Echevarria, 2019).

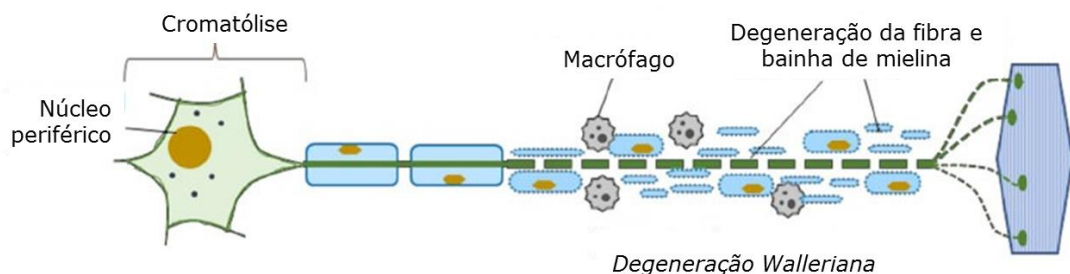


Figura 6: Representação esquemática da degeneração Walleriana. Detalhe para a fragmentação do axônio e bainhas de mielina e presença de macrófagos na extremidade distal do axônio. Adaptado de Arslantunali *et al.* (2014).

Os monócitos precursores de macrófagos, atraídos por quimiocinas, migram para a região lesionada, principalmente por via hematogênica, atravessando as paredes dos capilares (diapedese), que se tornam permeáveis na zona de lesão. Uma vez presentes no microambiente da lesão, os monócitos se diferenciam em macrófagos, que fagocitam eficientemente os restos axonais e mielínicos e, ainda, produzem fatores que facilitam a migração das células de Schwann, estabelecendo assim, a resposta inflamatória. As células de Schwann e os macrófagos trabalham juntos para fagocitar e limpar o local da lesão, em um processo inflamatório

degenerativo e reconstrutivo que requer de uma semana a vários meses para ser concluído (Burnett e Zager, 2004; Gaudet *et al.*, 2011; Sameem *et al.*, 2011).

A resposta inflamatória em uma LNP tem várias características comuns a qualquer outro local de lesão no corpo, ou seja, um rápido influxo de células do sistema imune, uma resposta pró-inflamatória precoce, seguida por uma resposta anti-inflamatória. No entanto, parece haver características distintas dos macrófagos nos microambientes do SNP, sugerindo que esse microambiente pode induzir a progressão de diferentes fenótipos macrofágicos; em grande parte, com o objetivo particular de remover detritos e contribuir para cascatas regenerativas (Stratton e Shah, 2016; Zigmond e Echevarria, 2019).

Os macrófagos exibem espectros entre dois fenótipos funcionais contrastantes, e assim são subdivididos distintamente nas categorias M1 e M2 (Figura 7). Este processo fenotípico representa os extremos do estado de mudança dinâmica dos macrófagos (Saqib *et al.*, 2018; Zigmond e Echevarria, 2019).

O fenótipo M1 é classicamente ativado, e sua ativação ocorre após uma lesão ou infecção por agentes nocivos, como produtos microbianos ou citocinas pró-inflamatórias, DAMPs (*damage-associated molecular pattern* / padrões moleculares associados a danos), PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern* / padrões moleculares associados a patógenos) como o lipopolissacarídeo bacterianos (LPS), interferon- γ (IFN- γ) ou fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Os macrófagos M1 também são caracterizados pela produção de citocinas pró-inflamatórias, liberação de interleucinas (IL)-12 e IL-23, altos níveis de intermediários reativos de oxigênio (IROS), óxido nítrico (NO), enzimas proteolíticas e radicais livres (Saqib *et al.*, 2018; Zigmond e Echevarria, 2019).

Já os macrófagos M2, são ativados por via alternativa e estímulos diferentes, e são observados na fase de cicatrização, sem a prevalência de infecção. Esses estímulos incluem IL-4 e IL-13, complexos imunes e receptor do tipo Toll (TLR), ligantes do receptor de IL-1 e IL-10. Eles são ainda caracterizados pela secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, ligantes de quimiocina, e a suprarregulação de dectina-1, e produzem ornitina e poliaminas através da via da arginase. Também expressam em sua membrana, o receptor de manose (CD206), receptor de sequestrador A, CD163, receptor de quimiocina CC tipo 2, receptor de quimiocina CXC 1 e 2, entre outros. Assim, protegem células adjacentes, promovendo angiogênese e cicatrização em estágios posteriores de recuperação, estando

associados à remodelação construtiva do tecido (Saqib *et al.*, 2018; Zigmond e Echevarria, 2019).

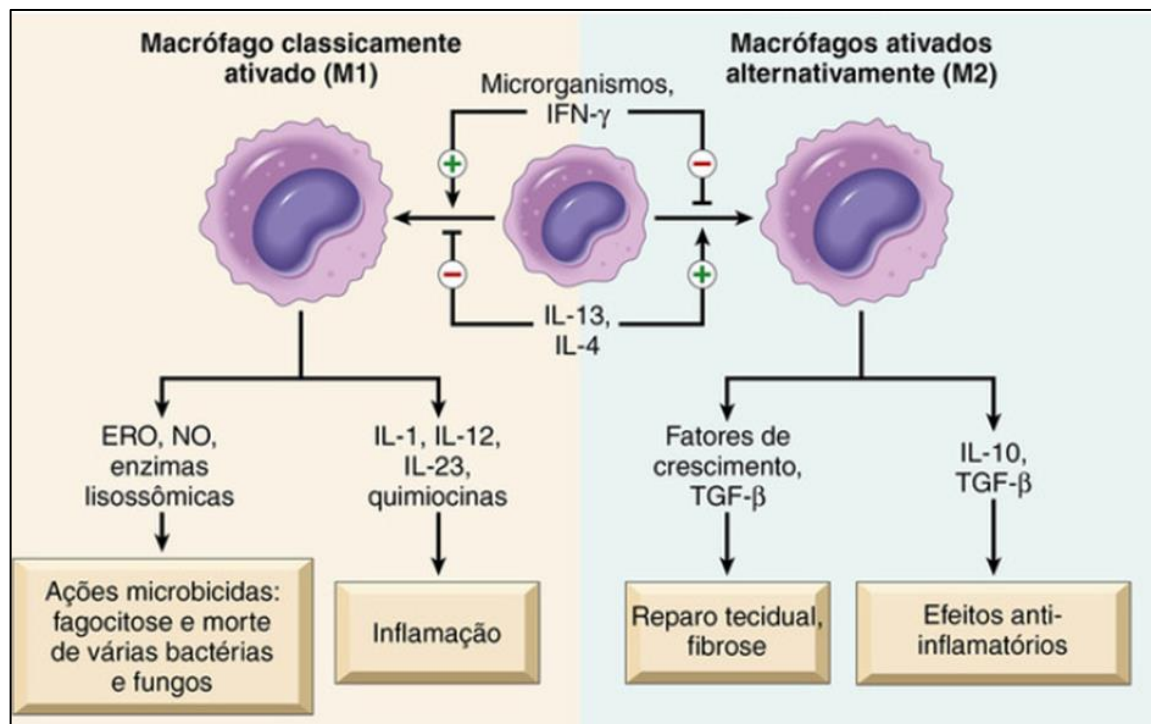


Figura 7: Divisão fenotípica dos macrófagos M1 e M2 e suas respectivas vias ativação e atuação. Kumar (2010).

Lee *et al.* (2018) acompanharam a população de macrófagos aos 3, 14 e 28 dias após LNP, e verificaram que em todos os tempos a população de macrófagos M1 e M2 estavam presentes. Sendo que, no dia 3, a maioria dos macrófagos apresentou fenótipo M1; no dia 14, a maioria dos macrófagos não era específica de M1 ou M2, ou seja, expressavam ambas as características, não sendo possível diferenciá-los. Já no dia 28 o fenótipo M2 era predominante. Esses dados sugerem que nas duas primeiras semanas após a LNP, pode haver alteração do fenótipo de macrófagos de M1 para M2 (Zigmond e Echevarria, 2019).

Macrófagos M2 são cruciais em vários ambientes de lesão, pois esse fenótipo promove a maturação e diferenciação celular e fornecem suporte trófico para aumentar o crescimento axonal (Stratton e Shah, 2016).

Um equilíbrio entre os macrófagos M1 e M2 é muito importante em nível basal, bem como no nível avançado da regulação imunológica, pois qualquer desequilíbrio nos dois estados poderia causar a desregulação das vias

imunológicas. A plasticidade da transição de macrófagos pode ser atribuída às complexas vias de sinalização associadas aos dois fenótipos. Como várias moléculas comuns a ambos os fenótipos estão envolvidas na transição, pode ser bem entendido que a interconversão é principalmente devido ao efeito de um subconjunto no outro e vice-versa (Saqib *et al.*, 2018).

A regeneração de axônios do SNP não é autônoma, mas altamente influenciada por células não neuronais, principalmente células de Schwann e macrófagos (Zigmond e Echevarria, 2019).

Durante o processo inflamatório degenerativo e reconstrutivo, a área de contato sináptica é invadida por células de Schwann, que influenciam o crescimento axonal através da ação de fatores neurotróficos a partir da parte proximal do axônio (Lundborg, 2000; Cunningham *et al.*, 2020).

A partir do nodo de Ranvier os axônios começam a emitir ramificações em direção à parte distal, continuando seu crescimento ao longo das bandas de Büngner, as quais são formadas pelas células de Schwann que se dividem e se organizam no interior de tubos de membrana basal, linearmente (Lundborg, 2000; Rodrigues e Silva, 2001; Cunningham *et al.*, 2020). Deste modo, nos nervos pós-lesão, as poucas fibras nervosas presentes estão em degeneração, com formato irregular, diâmetro variado e associadas a grande quantidade de tecido conjuntivo (Maciel *et al.*, 2013; Buchaim *et al.*, 2015; Leite *et al.*, 2019).

Em uma visão global, após uma LNP diversas cascatas são acionadas para tentar conter os danos e estabilizar os processos fisiológicos. As células dos tecidos lesionados produzem e liberam substâncias químicas locais e sistêmicas, e imediatamente ocorre uma ativação da cascata de coagulação, à medida que as plaquetas e outros agentes hemostáticos recrutados liberam uma vasta gama de citocinas em resposta ao trauma tecidual local (Wang *et al.*, 2017).

É bastante importante a relação que se estabelece entre o sistema nervoso e o sistema vascular, cuja interação é considerada crítica tanto no desenvolvimento como na regeneração dos tecidos (Lu *et al.*, 2019). Em relação à regeneração nervosa, a revascularização parece ser um fator chave (Ferretti *et al.*, 2003).

Uma reconstrução vascular rápida e adequada, além de ser um pré-requisito, é também um passo na direção certa para a recuperação tecidual após lesão (Li *et al.*, 2017), já que, a falta de suprimento sanguíneo é um fator limitante definitivo para

a regeneração (Novosel *et al.*, 2011). Ferretti *et al.* (2003) demonstraram em um modelo equivalente a pele humana transplantada que a vascularização precede o processo de inervação, indicando que o desenvolvimento do tecido nervoso é conduzido por fatores tróficos e nutricionais fornecidos pelo sistema vascular. Além disso, Cattin *et al.* (2015) reportaram que células endoteliais vasculares guiam diretamente a regeneração axonal, confirmando essa relação precisa entre a angiogênese e a regeneração nervosa.

Além dos macrófagos, os mastócitos são uma das principais células efetoras dos processos inflamatórios gerais e formam uma conexão importante entre os sistemas nervoso e imune, sendo uma das primeiras células da resposta imune inata a responder à ativação nervosa sensorial (Green *et al.*, 2019). Quando ativados, os mastócitos secretam uma ampla gama de mediadores inflamatórios como as IL-6 e IL-8, e fatores de crescimento como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) (Gaber *et al.*, 2014), além de diversas outras substâncias reguladoras de angiogênese como proteases, triptases, FGF (fator de crescimento de fibroblasto), TNF- α , histaminas e heparina, os quais tem um importante papel na neovascularização local (Norrby, 2002).

Outra ação desencadeada pelos mastócitos é a estimulação de fibroblastos, células epiteliais e macrófagos, levando a secreção de mais proteases e citocinas com propriedades angiogênicas (Hiromatsu e Toda, 2003). A liberação de mediadores específicos como as aminas vasoativas, triptases, IL-4 e NGF (fator de crescimento nervoso) dos mastócitos é essencial para o processo inicial da regeneração das fibras nervosas danificadas (El-Agamy, 2012). Essas citocinas agem na redução do limiar de ativação dos neurônios, promovendo o crescimento das fibras nervosas no local da lesão (Ilkhanizadeh *et al.*, 2017).

As LNPs, quando ocorrem em nervos motores e mistos, resultam no comprometimento do sistema neuromuscular causando prejuízo a inervação do músculo, gerando, assim, diversas alterações morfológicas, dentre elas a redução da área das fibras, e aumento do número de mionúcleos e de células satélites. Ultraestruturalmente as fibras musculares apresentam dano mitocondrial, vacuolização e desorganização de sarcômeros (Moimas *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2019).

Devido à grande plasticidade do tecido muscular estriado esquelético, há tentativas de remodelação e regeneração após LNP (Sakuma *et al.*, 2016; Leite *et al.*, 2019). No entanto, esta regeneração pode não ser eficiente, havendo substituição da área das fibras musculares por tecido conjuntivo de preenchimento (rico em fibras colágenas) e a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, caracterizando um quadro de fibrose, levando a diminuição da capacidade de contração do músculo (Alluin *et al.*, 2009). Neste caso, também pode ocorrer diminuição do peso do músculo e da área das fibras musculares, possíveis indicativos de atrofia (Fagundes *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2007).

Além do nervo e do músculo, a junção neuromuscular (JNM) sofre instabilidade após LNP, levando a diversas alterações estruturais, funcionais e moleculares (Kurimoto *et al.*, 2015; Leite *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2020).

A longo prazo, a desnervação leva a uma desorganização da JNM, acarretando na redistribuição dos receptores de acetilcolina através da fibra muscular (Kurimoto *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2020). Tem sido descrito ainda o aumento da área de fragmentação da JNM, além de um aumento na profundidade da goteira sináptica (Ma *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2020).

Mesmo com os avanços nos procedimentos cirúrgicos, as reconstruções nervosas resultam apenas em torno de 51% de recuperação motora. Muitos trabalhos mostram a regeneração morfológica do nervo e do músculo, entretanto essa não está associada a uma recuperação funcional, ainda que haja regeneração axonal e JNMs em aparência morfológica normal, a falha na ativação elétrica muscular persiste (Sakuma *et al.*, 2016).

1.6. ABORDAGENS DE REPARO DO NERVO PERIFÉRICO

Dentre as técnicas para correção das neurotmeses, a neurorrafia término-terminal é a mais clássica e, ainda, a mais utilizada na atualidade (Wu *et al.*, 2014). Sendo que este tipo de neurorrafia só é possível de ser realizada quando os cotos nervosos apresentam-se preservados, visíveis e íntegros, sem perda de tecido, não havendo tensão para reaproximação e reconexão dos mesmos (Biscola *et al.*, 2017). Quando não há tais características propícias para a reconexão, outras técnicas são utilizadas, entre elas: neurorrafia término-lateral (Viterbo *et al.*, 2017), enxertos e conduites (Mozafari *et al.*, 2018), eletroestimulação e fotobiomodulação (Hussain *et*

al., 2020), e o uso de adjuvantes como os selantes de fibrina (Leite *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2020).

Nos últimos anos várias estratégias vêm sendo utilizadas a fim de promover uma maior habilidade dos axônios para restabelecer a área de injúria (Ray e Mackinnon, 2010). Entretanto, esses avanços referentes a tratamento cirúrgico nem sempre restabelecem a força e destreza muscular anterior à lesão (Kang *et al.*, 2011; Griffin *et al.*, 2013).

1.7. SELANTES DE FIBRINA

Um importante adjuvante que tem sido utilizado no reparo de LNP são os selantes de fibrina, também denominados de colas de fibrina (Hussain *et al.*, 2020).

Ao longo dos anos, os materiais e técnicas de sutura têm apresentado problemas e limitações, o que motivou pesquisas sobre materiais adesivos que podem unir tecidos. Substâncias deste tipo, que podem conectar tecidos mais rapidamente são importantes, pois promovem além da adesão tecidual a hemostasia (Barros *et al.*, 2009).

As primeiras pesquisas sobre agentes hemostáticos e adesivos iniciaram por volta de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, quando a cola de fibrina foi proposta. Naquele período, uma mistura de fibrinogênio e trombina humanos era aplicada principalmente em áreas da pele afetadas e outros ferimentos advindos da Guerra. Em 1970, o conceito de cola de fibrina foi reavaliado, dando origem aos selantes de fibrina. Desde então, um novo adesivo foi padronizado, contendo fibrinogênio humano e trombina bovina. Estes selantes foram comercializados com sucesso por anos (Spotnitz, 2010; Ferreira *et al.*, 2017).

Em 1978, nos Estados Unidos (EUA), a Food and Drug Administration (FDA) suspendeu sua comercialização e proibiu seu uso, devido ao risco de transmissão de doenças infecciosas, veiculadas por produtos derivados de sangue humano (Barros *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2017). No início dos anos 1980, houve a descoberta do vírus da imunodeficiência humana (HIV), o que acrescentou mais credibilidade à posição da FDA, que temia uma transmissão viral generalizada (Fattahi *et al.*, 2004). Em maio de 1998, a FDA revogou a suspensão e aprovou a aplicação clínica de selantes de fibrina nos EUA, quando voltaram a ser comercializados (Fattahi *et al.*, 2004).

De forma geral, os selantes de fibrina são produzidos de duas maneiras: a partir de derivados de sangue autólogos ou homólogos. Os selantes autólogos utilizam o próprio sangue do paciente. Embora biocompatível e não apresentando risco de transmissão de doenças infecciosas, não são viáveis em cirurgias e aplicações de emergência. Como alternativa, os selantes de fibrina homólogos, produzidos por um *pool* de sangue humano, têm sido utilizados. Porém, nesses casos, há riscos de transmissão de doenças infecciosas como hepatite, HIV e parvovírus humano (Buchaim *et al.*, 2019).

Até os dias atuais, os selantes de fibrina de uso comercial são produzidos a partir de trombina bovina e fibrinogênio humano (selantes homólogos), que apresentam desvantagens e riscos, de modo que além de poderem ser transmissores de doenças infecciosas, podem gerar fibrose, toxicidade e necrose (Hussain *et al.*, 2020). Também podem acarretar no desenvolvimento de anticorpos contra a trombina bovina, entre outras reações adversas (Barros *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2017).

Considerando essas desvantagens, em 1989 um grupo de pesquisadores brasileiros iniciou o desenvolvimento de um novo selante de fibrina (Barros *et al.*, 2009), atualmente denominado de biopolímero heterólogo de fibrina.

1.8. BIOPOLÍMERO HETERÓLOGO DE FIBRINA

O Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Câmpus de Botucatu, São Paulo, Brasil, desenvolveu o biopolímero heterólogo de fibrina (BHF), antes denominado de selante heterólogo de fibrina ou cola de fibrina (Figura 8A) (Buchaim *et al.*, 2019).

O BHF é composto por duas frações e um diluente (Figura 8B). A fração I contém a proteína/enzima gioxina, uma serino-protease *trombina-like* extraída da peçonha de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). A fração II é composta por um crioprecipitado de plasma fresco congelado, advindo do sangue de bubalinos (*Bubalus bubalis*), contendo: fibrinogênio em altas concentrações (entre 150 e 250 mg), fator VIII, fator de von Willebrand, fator XIII e fibronectina. O diluente contém uma solução estável de cloreto de cálcio (Ferreira *et al.*, 2017).

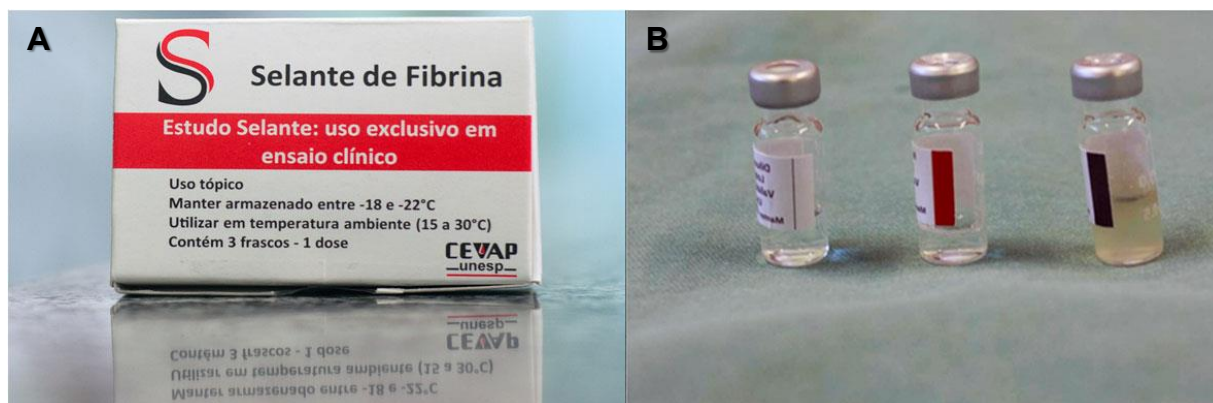


Figura 8: Embalagem e frascos do biopolímero heterólogo de fibrina. **A:** Embalagem (contendo o nome antigo “Selante de Fibrina”). **B:** Frascos contendo as Frações I, II e diluente. Adaptado de Ferreira et al., 2017.

Devido à sua atividade enzimática, semelhante à trombina, a giroxina (serino-protease) atua sobre o fibrinogênio, clivando-o. Os monômeros de fibrina resultantes são polimerizados em uma rede estável intensa (Figura 9A, B), em contraste com a que tradicionalmente é produzida pela trombina (Ferreira *et al.*, 2017).

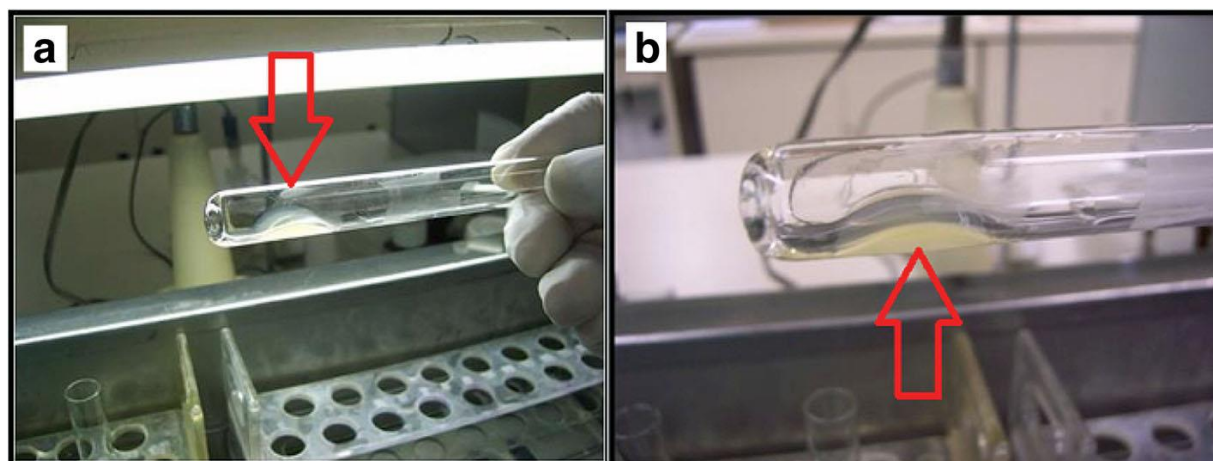


Figura 9: Atividade coagulante da giroxina (serino-protease). **A e b:** Coágulo de fibrina formado após diluição de fibrinogênio com giroxina, mimetizando o BHF. **Seta:** Detalhe da rede de fibrina. Ferreira et al., 2017.

O BHF é um biopolímero natural, biodegradável e bioabsorvível, possui grande capacidade adesiva e não produz reações adversas, além de ser não tóxico (Ferreira, 2014; Ferreira *et al.*, 2017; Buchaim *et al.*, 2019).

Por não possuir sangue humano, é considerado o único biopolímero de fibrina heterólogo, e devido a isso, não é transmissor de doenças infecciosas, podendo assim ser utilizado na clínica médica e em diversos procedimentos cirúrgicos como enxertos de pele, reconstrução de nervos periféricos, auxiliar na hemostasia, colostomia, reforçar a ação de suturas convencionais, entre outros (Ferreira, 2014; Biscola *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2017; Buchaim *et al.*, 2019).

Estudos revelaram que muitos biomateriais reconstrutivos, principalmente os biopolímeros atenuam a resposta macrofágica M1 e aumentam a relação M2:M1, ou seja, uma maior proporção de macrófagos M2, indicando que muitos biopolímeros podem desintensificar a resposta pró-inflamatória e facilitar a remodelação tecidual (Faulk *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2018). Entre os biopolímeros temos o BHF que surge como potencial adjuvante ao processo de regeneração, contribuindo para o microambiente de crescimento axonal (Biscola *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2019).

Em ensaios clínicos de fase I/II em humanos, o BHF demonstrou bons resultados no processo de cicatrização, como no tratamento de úlceras venosas crônicas, devido a suas propriedades seguras e de fácil aplicação, levando a redução da dor após oito semanas de uso (Abbade *et al.*, 2020; Abbade *et al.*, 2021).

Para o reparo de lesões ósseas, a associação do BHF com terapia a laser de baixa intensidade (fotobiomodulação) mostrou potencial para auxiliar no processo de reconstrução de defeitos ósseos na tíbia de ratos (Rosso *et al.*, 2020), e em associação com proteínas ósseas recombinantes mostrou alta capacidade osteogênica e ação osteocondutora na recuperação óssea (Machado *et al.*, 2015).

Spejo *et al.* (2018) descrevem também efeitos do BHF no SNC, no qual, após avulsão e reimplantação da raiz ventral do plexo braquial de ratos, demonstrou potencial imunomodulatório, com o aumento da expressão gênica de marcadores de macrófagos M1 e M2 e citocinas pró e anti-inflamatórias, e ainda contribuiu para uma maior sobrevivência neuronal. Concluindo que o BHF pode estimular o recrutamento e a migração de macrófagos e, ainda, a depuração de tecidos.

O uso do BHF, principalmente como adjuvante na reconstrução de nervos periféricos vem apresentando resultados promissores (Biscola *et al.*, 2017; Buchaim *et al.*, 2019; Leite *et al.*, 2019; Hussain *et al.*, 2020; Pinto *et al.*, 2020).

Nesse contexto, Leite *et al.* (2019) evidenciaram que aos 60 dias após reconstrução do nervo isquiático, o BHF quando associado à neurorrafia, potencializou a regeneração axonal e ainda permitiu a redução do número de pontos quando comparado a neurorrafia isolada, com a consequente diminuição do tempo de procedimento cirúrgico. Mozafari *et al.* (2018) também obtiveram resultados semelhantes no mesmo período experimental, utilizando o BHF associado a células tronco embrionárias. Buchaim *et al.* (2016) observaram melhora significativa na recuperação do nervo facial após a utilização do BHF associado à fotobiomodulação.

Em outros estudos, também buscando tratamento para LNPs, o BHF obteve desempenho similar ou melhor, quando comparado com sutura tradicional (Buchaim *et al.*, 2015) e mostrou ter característica de fácil utilização com boa capacidade adesiva, e boa biocompatibilidade com outros materiais (Buchaim *et al.*, 2019).

O BHF também demonstrou efeitos positivos em outras aplicabilidades, como aumento de 50% da função motora e efeito imunomodulatório quando associado ao dimetil fumarato em ratos submetidos à avulsão e reimplantação das raízes ventrais do plexo braquial (Kempe *et al.*, 2020).

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

As LNPs determinam um número significativo de indivíduos com incapacidade sensorial e motora. Embora haja avanços nos procedimentos cirúrgicos que envolvem diferentes técnicas, as reparações nervosas resultam apenas em torno de 51% de recuperação motora.

Enquanto muitos trabalhos mostram que há regeneração morfológica do nervo e do músculo, isso não está associado a uma recuperação funcional após LNP, ainda que haja regeneração axonal, com as JNMs em aparência morfológica normal, a falha na ativação elétrica muscular persiste.

A utilização do BHF como adjuvante para a reconstrução de nervos surge como um procedimento economicamente viável e livre de reações adversas. Além disso, o BHF atua como arcabouço, contribuindo para o microambiente de crescimento axonal e favorecendo a regeneração nervosa.

Assim, esse estudo visa contribuir para o entendimento do papel do microambiente fornecido pelo BHF, visando futuras intervenções no reparo de LNPs.

Objetivo

3. OBJETIVO

Avaliar os efeitos da reconstrução nervosa via neurorrafia associada ao biopolímero heterólogo de fibrina, aos 7 e 30 dias após reparo do nervo isquiático, no microambiente da lesão e na interação neuromuscular, com ênfase na regeneração nervosa e resposta imune e na morfologia do nervo, músculo e junções neuromusculares.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 40 ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Unesp, Câmpus de Botucatu, com 90 dias de idade e peso corporal médio entre 300 e 400g. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos no Biotério de Roedores 1 da Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp), em caixas de polietileno (medindo 40 x 30 x 15 cm), com fundos sólidos forrados com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12 h claro/12 h escuro), temperatura (24 ± 2 °C), sendo fornecida água filtrada e ração Presence® *ad libitum*.

O projeto de pesquisa e todos os protocolos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/Unesp) sob protocolo número 1177/2019 (Anexo).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

1. Controle (C)
2. Desnervado (D)
3. Sutura (S)
4. Sutura + BHF (SB)

A fim de verificar os efeitos da reconstrução nervosa via neurorrafia associada ao BHF nos processos degenerativos e regenerativos, bem como transição entre eles, os animais foram eutanasiados em 2 momentos: aos 7 dias ($n = 5/\text{grupo}$) e aos 30 dias ($n = 5/\text{grupo}$) após a cirurgia.

4.2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Trinta minutos antes foi realizada profilaxia antimicrobiana com a aplicação de Enrofloxacino (Baytril®, 10 mg/kg) via subcutânea.

Os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina (Dopalen, 90 mg/kg) e Xilazina (Anasedan, 10 mg/kg).

Após tricotomia do membro pélvico direito, os animais foram posicionados em decúbito ventral, mantendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução (Figura 10). Foi realizada a aplicação de Lidocaína (7 mg/kg) no local da incisão e

antisepsia com álcool-iodado, seguida de incisão sobre a face lateral da coxa, desde a altura do trocânter maior do fêmur até o joelho/fossa poplíteia (Figura 10. Figura 11A, B), e os nervos isquiáticos direitos foram expostos (Figura 11C).

Nos animais do grupo C foi realizada apenas a localização e dissecação do nervo isquiático (Figura 11C), sendo em seguida a os tecidos moles e a pele suturados (Mononylon 5-0, Polysuture).

Nos animais dos grupos D, S e SB de forma padronizada, a cerca de 3 milímetros acima de sua trifurcação (Figura 10) , foi realizada uma lesão nervosa por transecção (neurotome) do nervo isquiático.

Nos animais do grupo D, a fim de evitar regeneração espontânea, foi removido um fragmento de 6 milímetros do nervo isquiático, os cotos proximais e distais foram invertidos a 180 graus e fixados na tela subcutânea (Figura 11D), com pontos simples com fio de nylon (Mononylon 10-0, Polysuture). Nos grupos S e SB, logo após a neurotome os cotos nervosos foram reaproximados e submetidos à microcirurgia reconstrutiva. No grupo S os cotos foram religados através de sutura (neurorrafia término-terminal) por meio de anastomose epineural com 2 pontos simples (Figura 11E), com fio de nylon (Mononylon 10-0, Polysuture). No grupo SB, a reconstrução nervosa foi realizada por sutura (neurorrafia término-terminal/ 2 pontos) seguida da aplicação de 250 µL do BHF (Figura 11F), cedido pelo CEVAP, Unesp Botucatu, SP, Brasil, cujos componentes e fórmula de aplicação constam de suas patentes (Números de registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). No momento do uso, os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados sobre o local da lesão de acordo com Ferreira *et al.* (2017).

Após a realização da reconstrução nervosa, os tecidos moles foram suturados com pontos simples utilizando fio de nylon (Mononylon 5-0, Polysuture) e os animais ficaram sob aquecimento até a recuperação.

Nos três dias consecutivos, o protocolo pós-cirúrgico contemplou Enrofloxacino (Baytril®, 10 mg/kg) e Tramadol (5 mg/kg), via subcutânea por 3 dias a cada 12 h e se necessário até 5 dias. Além disso, foi utilizado Rifocina spray (uso tópico) no local da incisão.

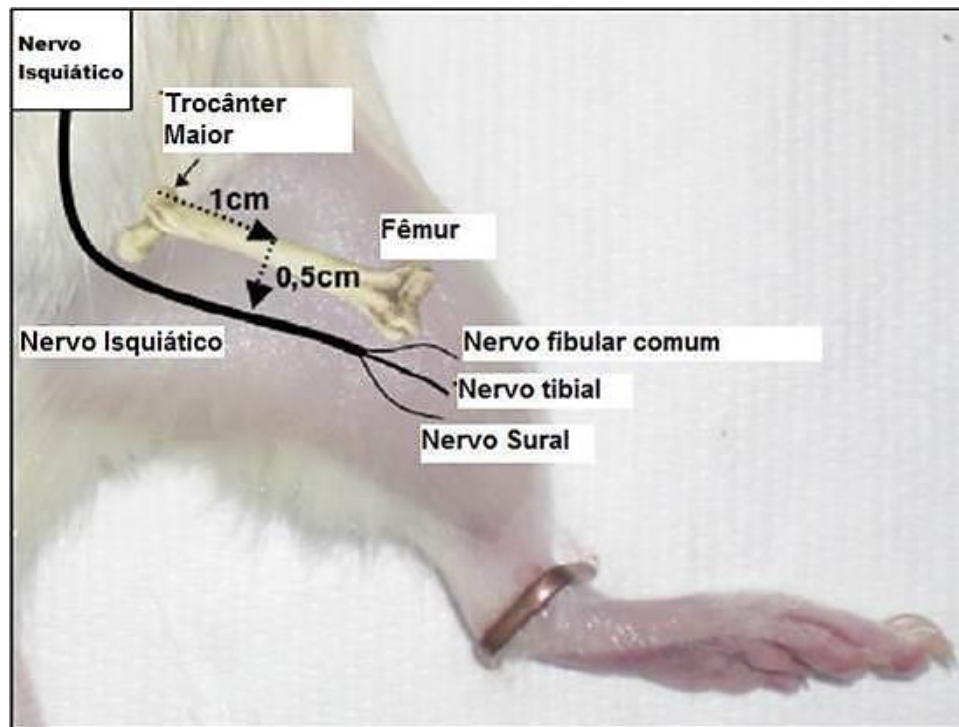


Figura 10: Representação esquemática do trajeto e localização anatômica do nervo isquiático em modelo de rato Wistar, posicionado em decúbito ventral com vista da região caudo-lateral do membro pélvico após tricotomia. Observa-se sua ramificação (trifurcação), dando origem aos nervos (lateral para medial) fibular comum, tibial e sural. Detalhe do trocânter maior do fêmur, marco anatômico característico para correta localização do nervo isquiático. Adaptado de Savastano *et al.* (2014) apud Debastiani (2017).

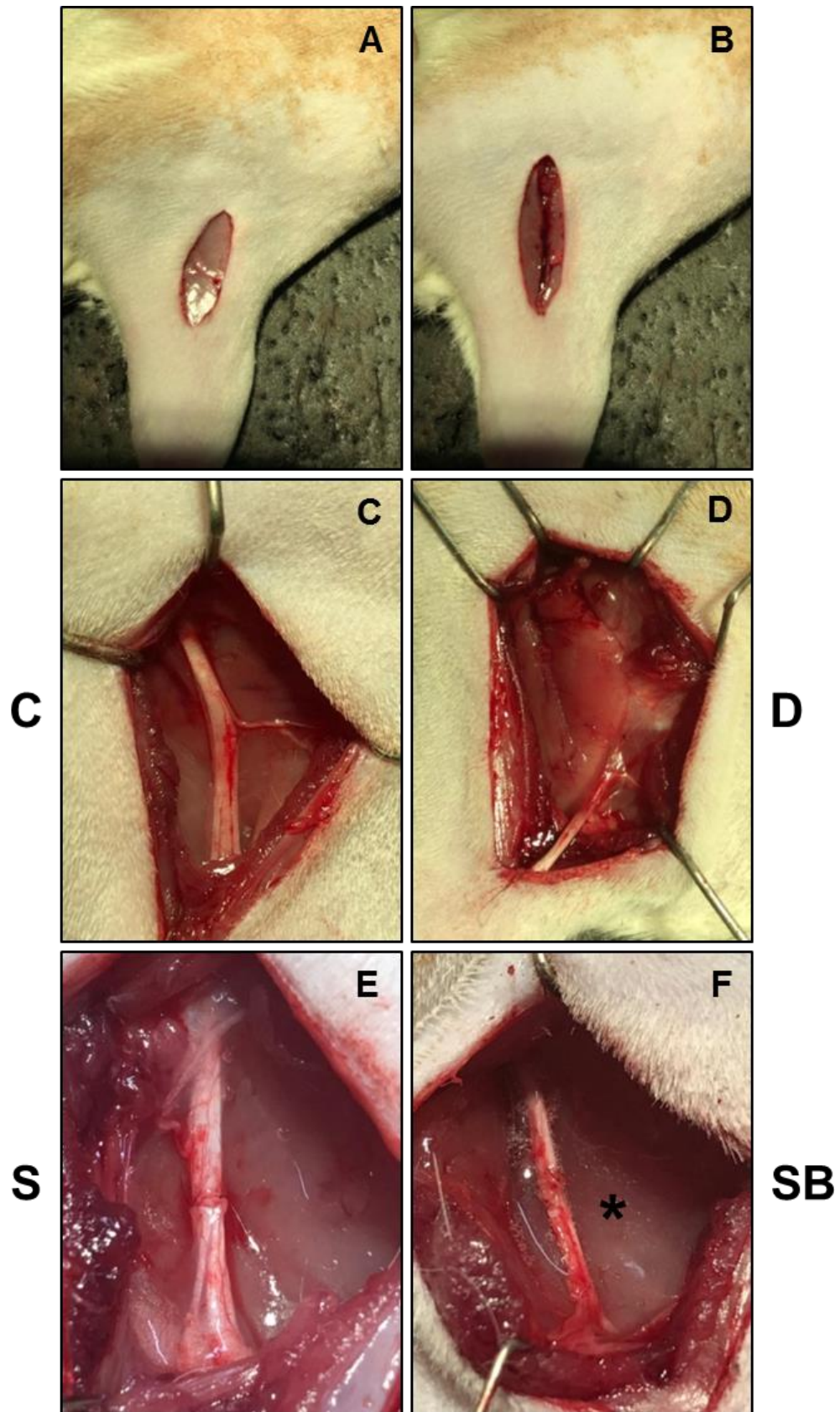


Figura 11: Fotografias das técnicas cirúrgicas realizadas em todos os grupos experimentais. A e B: Incisão. C: Localização do nervo isquiático (grupo C). D: Neurotome, inversão e fixação dos cotos proximal e distal (grupo D). E: Detalhe da neurorafia (grupo S). F: Detalhe da neurorafia associada ao BHF (grupo SB). Asterisco (*): rede de fibrina formada pelo BHF.

4.3. EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS TECIDUAIS

Decorridos os períodos experimentais, aos 7 e 30 dias após a cirurgia, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina (Dopalen, 90 mg/kg) e Xilazina (Anasedan, 10 mg/kg), e submetidos à perfusão intracardíaca. Para isso, foi realizada tricotomia da região peitoral, seguida de toracotomia e exposição das vísceras torácicas, e a perfusão ocorreu por meio do ventrículo esquerdo e canulação da aorta, com bomba dosadora peristáltica Milan®, inicialmente com PBS (tampão fosfato salino) a 0,1 M e posteriormente fixação com paraformaldeído a 4%, ambos em um fluxo de 30 mL/min. A aurícula direita foi seccionada junto ao átrio direito para escoamento do sangue e de líquidos excedentes. Em seguida, os nervos isquiáticos direitos foram coletados para análise morfológica e morfométrica das fibras nervosas e imunomarcagem dos macrófagos, e os músculos sóleos direitos coletados para análise morfológica e morfométrica das fibras musculares e JNMs e para quantificação do tecido conjuntivo.

4.4. IMUNOMARCAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MACRÓFAGOS

Os fragmentos do nervo isquiático da área da reconstrução foram fixados em paraformaldeído a 4% por 24 h, crioprotetidos em sacarose (diluída em PBS 0,1 M) 10%, 20% e 30% por 24 h cada, embebidos em meio de congelamento (Tissue-Plus® O.C.T. Compound, Fisher Healthcare) congelados em N- hexano resfriado em nitrogênio líquido, armazenados em biofreezer a -80 °C, seccionados longitudinalmente (12 µm) em criostato (Leica CM1850) e os cortes fixados em lâminas silanizadas. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS 0,1 M (3 vezes de 5 min), incubados em Triton® X-100 (TX-100) a 4% (diluído em PBS 0,1 M) por 1 h, bloqueados com BSA 3% (diluído em PBS 0,1 M + TX-100 2%) por 1 h. Todos os anticorpos utilizados foram diluídos em solução de incubação (PBS 0,1 M + BSA 1% + TX-100 0,2%).

Os CD206/receptores de manose (macrófagos M2) foram marcados por meio de incubação overnight a 4 °C com anticorpo anti-CD206 (anti-receptor de manose - rabbit - ab64693) (1:200). Os cortes, a seguir, foram lavados com PBS 0,1 M (3 vezes de 5 min) e incubados com anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor® 488 (goat anti-rabbit - ab150077) (1:600), por 1 h em temperatura ambiente. Após, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M (3 vezes de 10 min) e as lâminas foram

montadas utilizando VECTASHIELD® com DAPI, e foram fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Leica CTR4000). Foram obtidas imagens das totalidades dos cortes presentes nas lâminas. A quantificação dos macrófagos M2 foi realizada por meio da área relativa (%), obtida utilizando a ferramenta Threshold do software ImageJ (v.1.53).

4.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO NERVO ISQUIÁTICO

Os cotos distais dos nervos isquiáticos após fixação em solução de Karnovsky (glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 4% em PBS 0,1 M, pH 7,4) foram processados seguindo rotina do laboratório de Histotecnologia - Historesina da Unipex (FMB/Unesp), onde após inclusão em historesina, foram seccionados transversalmente, cerca de 2 µm de espessura, em ultramicrótomo (Leica RM2265) e corados com tetróxido de ósmio e azul de toluidina. As lâminas histológicas foram fotografadas por meio do analisador de imagens Olympus Bx41 (câmera SC30) e foram obtidas imagens de 5 campos aleatórios em aumento de 400x. Por meio do *software* ImageJ (v.1.53), as imagens foram analisadas e obtidos os valores da área e perímetro do nervo, número de axônios íntegros, número de mastócitos, número de vasos sanguíneos, área vascular, densidade vascular (área vascular/área do nervo x 100%) e o número de vasos sanguíneos por axônio.

4.6. ANÁLISE DAS FIBRAS MUSCULARES E QUANTIFICAÇÃO DE TECIDO CONJUNTIVO

Após a coleta, as extremidades dos músculos sóleos foram fixadas em formol tamponado 10% por 24 h, lavados em água corrente por 48 h, incluídos em Paraplast®, seccionados em micrótomo (4 µm) e confeccionadas 2 lâminas para cada animal de cada grupo experimental. Cada uma delas foi submetida, respectivamente, à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM). As lâminas confeccionadas foram fotografadas em aumento de 200x por meio do microscópio Olympus Bx41 (câmera SC30).

4.6.1. Análise morfológica e morfométrica das fibras musculares

A lâmina foi submetida à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e aproximadamente 200 fibras musculares foram selecionadas a partir de 3 a 4 campos aleatórios (Leite *et al.*, 2019). Esta quantificação foi realizada através do *software* ImageJ (v.1.53) (Schneider *et al.*, 2012), no qual foram analisados área, perímetro, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, angulação e circularidade das fibras musculares e realizada a contagem do número de núcleos centrais.

4.6.2. Quantificação de tecido conjuntivo

A lâmina foi submetida à coloração de Tricrômico de Masson, pela qual o tecido conjuntivo foi corado em verde e as fibras musculares em vermelho. A quantificação do tecido conjuntivo foi realizada por meio da área e porcentagem obtidas através do *software* ImageJ (v.1.53), em que as áreas em verde foram detectadas automaticamente, utilizando ferramenta *Threshold* do *software* (Schneider *et al.*, 2012).

4.7. ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DAS JNMs

O terço médio dos músculos sóleos (região contendo o ponto motor) foi fixado em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2% + paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M, pH 7,4), e por meio do uso de uma lâmina metálica, foram realizadas duas secções longitudinais, as quais foram submetidas à reação de esterase inespecífica, para caracterização das JNMs (Lehrer e Ornstein, 1959). As peças foram lavadas durante 5 min em água corrente e 1 min em PBS (0,1 M; pH 7,4), incubadas a 37 °C durante 5 a 10 min, no seguinte meio (pH 6,8 - 7,2): 20 mL de solução Tris HCl (6,05 g de tris aminometano + 3,34 mL de ácido clorídrico concentrado + 100 mL de água destilada), 0,5 mL de alfa-naftil acetato a 1% (1,0 g de alfa-naftil + 100 mL de propanona/acetona) e 1,6 mL de pararosanilina azotizada (0,8 mL de pararosanilina + 0,8 mL de nitrito de sódio a 4%). A solução estoque de pararosanilina consistiu em 1,0 mL de pararosanilina, 20 mL de água destilada e 5 mL de ácido clorídrico que, após a preparação, foi aquecida, resfriada e filtrada. Após a incubação no meio descrito acima, as peças foram lavadas em água corrente por 5 min, desidratadas (álcool 70%, 95% e 100%; 1 min cada), diafanizadas (xilol 100% I e II; 1 min cada) e

montadas em lâminas histológicas. A fotomicrografia das JNMs foi realizada em analisador de imagens Olympus Bx41 (câmera SC30). Foram tomadas medidas de área, perímetro, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, angulação, diâmetro de Feret, ângulo de Feret e Feret mínimo, de 50 junções para cada animal de cada grupo experimental. As medidas foram analisadas com o software ImageJ (v.1.53) (Schneider *et al.*, 2012).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis com dados aderentes à distribuição gaussiana (dados paramétricos), sendo elas: área e perímetro do nervo; área, perímetro, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, angulação, diâmetro de Feret, ângulo de Feret, Feret mínimo das JNMs; foi utilizada a técnica da análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni (Johnson e Wichern, 2014), e os dados foram expressos em média e erro padrão da média. Para análise da área, perímetro, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, angulação e circularidade das fibras musculares; área e porcentagem de tecido conjuntivo do músculo; e porcentagem de macrófagos, foi utilizada a técnica da análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (Zar, 2009), e os dados foram expressos em média e erro padrão da média. Para análise da área vascular e densidade vascular foi utilizada a técnica da análise de variância multivariada (MANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni (Johnson e Wichern, 2014), e os dados foram expressos em média e erro padrão da média. Para as variáveis com dados não aderentes à distribuição gaussiana (dados não paramétricos), sendo elas: número de axônios, número de vasos sanguíneos, número de mastócitos, número de vasos por axônio e número de núcleos centrais foi utilizada a técnica da análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (Zar, 2009), e os dados foram expressos em mediana, valor mínimo e valor máximo. Todos os dados foram considerados utilizando o nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Referências

5. REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. P. et al. Treatment of chronic venous ulcers with heterologous fibrin sealant: A phase I/II clinical trial. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 83, 2021. ISSN 1664-3224.
- ABBADE, L. P. F. et al. Chronic venous ulcers: a review on treatment with fibrin sealant and prognostic advances using proteomic strategies. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 26, 2020. ISSN 1678-9199.
- ALLUIN, O. et al. Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide. **Biomaterials**, v. 30, n. 3, p. 363-373, 2009. ISSN 0142-9612.
- ARSLANTUNALI, D. et al. Peripheral nerve conduits: technology update. **Medical Devices (Auckland, NZ)**, v. 7, p. 405, 2014.
- ASPLUND, M. et al. Incidence of traumatic peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006. **Neuroepidemiology**, v. 32, n. 3, p. 217-228, 2009. ISSN 0251-5350.
- BARROS, L. C. et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 12, n. 8, p. 553-71, Oct 2009. ISSN 1521-6950 (Electronic) 1093-7404 (Linking).
- BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. A. **Neuroscience: Exploring the brain**. Jones & Bartlett Learning, LLC, 2020. ISBN 1284211282.
- BISCOLA, N. P. et al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 13, 2017. ISSN 1678-9199.
- BUCHAIM, D. V. et al. Unique heterologous fibrin biopolymer with hemostatic, adhesive, sealant, scaffold and drug delivery properties: a systematic review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 2019. ISSN 1678-9199.
- BUCHAIM, D. V. et al. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. **Lasers in medical science**, v. 31, n. 5, p. 965-972, 2016. ISSN 0268-8921.
- BUCHAIM, R. L. et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. **Injury**, v. 46, n. 4, p. 655-660, 2015. ISSN 0020-1383.
- BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurg Focus**, v. 16, n. 5, p. E1, May 15 2004. ISSN 1092-0684 (Electronic) 1092-0684 (Linking).
- CATTIN, A.-L. et al. Macrophage-induced blood vessels guide Schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 1127-1139, 2015. ISSN 0092-8674.
- COLLI, B. O.; CARLOTTI JÚNIOR, C. Aspectos gerais das lesões traumáticas agudas dos nervos periféricos. **Arq Bras Neurocirurg**, v. 12, p. 171-200, 1993.

- CONTI-FINE, B. M.; MILANI, M.; KAMINSKI, H. J. Myasthenia gravis: past, present, and future. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 11, p. 2843-2854, 2006. ISSN 0021-9738.
- CUNNINGHAM, M. E. et al. Perisynaptic Schwann cells phagocytose nerve terminal debris in a mouse model of Guillain-Barré syndrome. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 25, n. 2, p. 143-151, 2020. ISSN 1085-9489.
- DEBASTIANI, J. C. Ação da proteína sericina em lesão nervosa isquiática, associada ao exercício físico de natação, em ratos wistar. 2017.
- EL-AGAMY, D. S. Targeting c-kit in the therapy of mast cell disorders: current update. **European journal of pharmacology**, v. 690, n. 1-3, p. 1-3, 2012. ISSN 0014-2999.
- FAGUNDES, K. et al. Analise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo apos desnervacao e estimulacao eletrica de baixa frequencia. **Braz J Phys Ther**, p. 235-241, 2005.
- FATTAHI, T.; MOHAN, M.; CALDWELL, G. T. Clinical applications of fibrin sealants. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 62, n. 2, p. 218-224, 2004. ISSN 0278-2391.
- FAULK, D. M. et al. ECM hydrogel coating mitigates the chronic inflammatory response to polypropylene mesh. **Biomaterials**, v. 35, n. 30, p. 8585-8595, 2014. ISSN 0142-9612.
- FELTEN, D. L.; O'BANION, M. K.; MAIDA, M. E. **Netter's atlas of neuroscience**. Elsevier Health Sciences, 2015. ISBN 0323265111.
- FERREIRA, R. S. Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice? **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 31, 2014. ISSN 1678-9199.
- FERREIRA, R. S. et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside—an overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 21, 2017. ISSN 1678-9199.
- FERRETTI, A. et al. Angiogenesis and nerve regeneration in a model of human skin equivalent transplant. **Life sciences**, v. 73, n. 15, p. 1985-1994, 2003. ISSN 0024-3205.
- GABER, M. A. et al. Mast cells and angiogenesis in wound healing. **Analytical and quantitative cytopathology and histopathology**, v. 36, n. 1, p. 32-40, 2014. ISSN 2578-742X.
- GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 110, 2011. ISSN 1742-2094.
- GEUNA, S. et al. Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. **International review of neurobiology**, v. 87, p. 27-46, 2009. ISSN 0074-7742.
- GREEN, D. P. et al. A mast-cell-specific receptor mediates neurogenic inflammation and pain. **Neuron**, v. 101, n. 3, p. 412-420. e3, 2019. ISSN 0896-6273.
- GRIFFIN, J. W. et al. Peripheral nerve repair and reconstruction. **JBJS**, v. 95, n. 23, p. 2144-2151, 2013. ISSN 0021-9355.

- HIROMATSU, Y.; TODA, S. Mast cells and angiogenesis. **Microscopy research and technique**, v. 60, n. 1, p. 64-69, 2003. ISSN 1059-910X.
- HUSSAIN, G. et al. Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 1, p. 116, 2020.
- ILKHANIZADEH, B. et al. Mast cells improve functional recovery of transected peripheral nerve: A novel preliminary study. **Injury**, v. 48, n. 7, p. 1480-1485, 2017. ISSN 0020-1383.
- JOHNSON, R.; WICHERN, D. others, **Applied multivariate statistical analysis, vol. 4:** Prentice-Hall New Jersey 2014.
- JONES, R. A. et al. Cellular and molecular anatomy of the human neuromuscular junction. **Cell reports**, v. 21, n. 9, p. 2348-2356, 2017. ISSN 2211-1247.
- JONES, S.; EISENBERG, H. M.; JIA, X. Advances and future applications of augmented peripheral nerve regeneration. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1494, 2016.
- KANG, J. R.; ZAMORANO, D. P.; GUPTA, R. Limb salvage with major nerve injury: current management and future directions. **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 19, p. S28-S34, 2011. ISSN 1067-151X.
- KEMPE, P. R. et al. Neuroprotection and immunomodulation by dimethyl fumarate and a heterologous fibrin biopolymer after ventral root avulsion and reimplantation. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 26, 2020. ISSN 1678-9199.
- KERNS, J. M. The microstructure of peripheral nerves. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 12, n. 3, p. 127-133, 2008. ISSN 1084-208X.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; GRAÇA, C. R.; FERREIRA, V. F. Peripheral nerve injuries: A retrospective survey of 1124 cases. **Neurology India**, v. 65, n. 3, p. 551, 2017. ISSN 0028-3886.
- KUMAR, V. **Robbins & cotran-patologia bases patológicas das doenças 8a edição.** Elsevier Brasil, 2010. ISBN 8535246339.
- KURIMOTO, S. et al. Activation of the Wnt/beta-catenin signaling cascade after traumatic nerve injury. **Neuroscience**, v. 294, p. 101-8, May 21 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking).
- LEE, S. et al. Targeting macrophage and microglia activation with colony stimulating factor 1 receptor inhibitor is an effective strategy to treat injury-triggered neuropathic pain. **Molecular pain**, v. 14, p. 1744806918764979, 2018. ISSN 1744-8069.
- LEHRER, G. M.; ORNSTEIN, L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. **The Journal of Cell Biology**, v. 6, n. 3, p. 399-406, 1959. ISSN 0021-9525.
- LEITE, A. P. S. et al. Heterologous fibrin sealant potentiates axonal regeneration after peripheral nerve injury with reduction in the number of suture points. **Injury**, v. 50, n. 4, p. 834-847, 2019. ISSN 0020-1383.

- LI, B. et al. VEGF-loaded biomimetic scaffolds: a promising approach to improve angiogenesis and osteogenesis in an ischemic environment. **RSC advances**, v. 7, n. 8, p. 4253-4259, 2017.
- LI, N. Y. et al. Epidemiology of Peripheral Nerve Injuries in Sports, Exercise, and Recreation in the United States, 2009–2018. **The Physician and Sportsmedicine**, p. 1-8, 2020. ISSN 0091-3847.
- LIN, T. et al. Hydrogel derived from porcine decellularized nerve tissue as a promising biomaterial for repairing peripheral nerve defects. **Acta biomaterialia**, v. 73, p. 326-338, 2018. ISSN 1742-7061.
- LU, J. et al. Synergistic effects of dual-presenting VEGF-and BDNF-mimetic peptide epitopes from self-assembling peptide hydrogels on peripheral nerve regeneration. **Nanoscale**, v. 11, n. 42, p. 19943-19958, 2019.
- LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. **The Journal of hand surgery**, v. 25, n. 3, p. 391-414, 2000. ISSN 0363-5023.
- MA, J. et al. Gene expression of myogenic regulatory factors, nicotinic acetylcholine receptor subunits, and GAP-43 in skeletal muscle following denervation in a rat model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 11, p. 1498-1505, 2007. ISSN 0736-0266.
- MACHADO, E. G. et al. A new heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. **Acta histochemica**, v. 117, n. 3, p. 288-296, 2015. ISSN 0065-1281.
- MACIEL, F. O. et al. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 28, n. 1, p. 39-47, 2013. ISSN 0102-8650.
- MALOMOUZH, A. I. Non-cholinergic signaling pathways at vertebrate neuromuscular junctions. In: (Ed.). **Skeletal Muscle-From Myogenesis to Clinical Relations**: InTech, 2012.
- MARTINI, F. H.; TIMMONS, M. J.; TALLITSCH, R. B. **Anatomia Humana-: Coleção Martini**. Artmed Editora, 2009. ISBN 853632029X.
- MOIMAS, S. et al. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. **Gene therapy**, v. 20, n. 10, p. 1014, 2013. ISSN 1476-5462.
- MOZAFARI, R. et al. Combination of heterologous fibrin sealant and bioengineered human embryonic stem cells to improve regeneration following autogenous sciatic nerve grafting repair. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 11, 2018. ISSN 1678-9199.
- MULLER, F. L. et al. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. **American journal of physiology-Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 3, p. R1159-R1168, 2007. ISSN 0363-6119.
- NORRBY, K. Mast cells and angiogenesis. **Apmis**, v. 110, n. 5, p. 355-371, 2002. ISSN 0903-4641.

- NOVOSEL, E. C.; KLEINHANS, C.; KLUGER, P. J. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 4-5, p. 300-311, 2011. ISSN 0169-409X.
- PINTO, C. G. et al. Heterologous fibrin biopolymer associated to a single suture stitch enables the return of neuromuscular junction to its mature pattern after peripheral nerve injury. **Injury**, 2020. ISSN 0020-1383.
- RAY, W. Z.; MACKINNON, S. E. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. **Experimental neurology**, v. 223, n. 1, p. 77, 2010.
- ROBINSON, L. R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle & nerve**, v. 23, n. 6, p. 863-873, 2000. ISSN 0148-639X.
- RODRIGUES, A. D. C.; SILVA, M. D. P. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. **Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery**, v. 21, n. 3, p. 102-107, 2001. ISSN 0738-1085.
- ROSSO, M. P. D. O. et al. Photobiomodulation Therapy Associated with Heterologous Fibrin Biopolymer and Bovine Bone Matrix Helps to Reconstruct Long Bones. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 383, 2020.
- SAKUMA, M. et al. Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. **European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 3, p. 451-462, 2016. ISSN 1460-9568.
- SAMEEM, M.; WOOD, T. J.; BAIN, J. R. A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 127, n. 6, p. 2381-2390, 2011. ISSN 0032-1052.
- SAQIB, U. et al. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17937, 2018.
- SAVASTANO, L. E. et al. Sciatic nerve injury: a simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. **Journal of neuroscience methods**, v. 227, p. 166-180, 2014. ISSN 0165-0270.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671, 2012. ISSN 1548-7105.
- SEDDON, H. Three types of nerve injury. **Brain**, v. 66, n. 4, p. 237-288, 1943. ISSN 1460-2156.
- SPEJO, A. et al. Neuroprotection and immunomodulation following intraspinal axotomy of motoneurons by treatment with adult mesenchymal stem cells. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2018. ISSN 1742-2094.
- SPOTNITZ, W. D. Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. **World J Surg**, v. 34, n. 4, p. 632-4, Apr 2010. ISSN 1432-2323 (Electronic) 0364-2313 (Linking).
- STAFFORD, M.; PENG, P.; HILL, D. Sciatica: a review of history, epidemiology, pathogenesis, and the role of epidural steroid injection in management. **British journal of anaesthesia**, v. 99, n. 4, p. 461-473, 2007. ISSN 0007-0912.
- STRATTON, J. A.; SHAH, P. T. Macrophage polarization in nerve injury: do Schwann cells play a role? **Neural regeneration research**, v. 11, n. 1, p. 53, 2016.

- SULLIVAN, R. et al. Peripheral nerve injury: stem cell therapy and peripheral nerve transfer. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 12, p. 2101, 2016.
- SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain**, v. 74, n. 4, p. 491-516, 1951. ISSN 1460-2156.
- TINTIGNAC, L. A.; BRENNER, H.-R.; RÜEGG, M. A. Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting. **Physiological reviews**, v. 95, n. 3, p. 809-852, 2015. ISSN 0031-9333.
- VITERBO, F. et al. End-to-side versus end-to-end neurorrhaphy at the peroneal nerve in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 697-705, 2017. ISSN 0102-8650.
- WALDRAM, M. Peripheral nerve injuries. **Trauma**, v. 5, n. 2, p. 79-96, 2003. ISSN 1460-4086.
- WANG, H. et al. Overlapping mechanisms of peripheral nerve regeneration and angiogenesis following sciatic nerve transection. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, p. 323, 2017. ISSN 1662-5102.
- WOLF, M. T. et al. Macrophage polarization in response to ECM coated polypropylene mesh. **Biomaterials**, v. 35, n. 25, p. 6838-6849, 2014. ISSN 0142-9612.
- WU, P. et al. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. **Neural regeneration research**, v. 9, n. 20, p. 1796, 2014.
- ZAR, J. Biostatistical Analysis, 4th Impression, Dorling Kindersley (India) Pvt. **Ltd., Delhi**, v. 110, p. 92, 2009.
- ZIGMOND, R. E.; ECHEVARRIA, F. D. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. **Progress in neurobiology**, v. 173, p. 102-121, 2019. ISSN 0301-0082.

Capítulo I

6. CAPÍTULO I

HETEROLOGOUS FIBRIN BIOPOLYMER ASSOCIATED WITH NEURORRHAPHY IMPROVES RAT SCIATIC NERVE REGENERATION

Felipe Cantore Tibúrcio^{1,2}, Kevin Silva Muller², Ana Paula Silveira Leite^{1,2}, Igor Araújo de Oliveira², Benedito Barraviera^{1,3}, Rui Seabra Ferreira Junior³, Carlos Roberto Padovani⁴, Carina Guidi Pinto², Selma Maria Michelin Matheus^{2*}

¹ São Paulo State University (Unesp), Medical School, Botucatu, São Paulo, Brazil.

² Department of Structural and Functional Biology (Sector of Anatomy), São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Botucatu, São Paulo, Brazil.

³ Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP), São Paulo State University (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Biostatistics, Vegetal Biology, Parasitology e Zoology (Sector of Biostatistics), São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Botucatu, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: Selma Maria Michelin Matheus, Department of Structural and Functional Biology (Sector of Anatomy), São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences. Rua Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, 250, Unesp Campus de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brazil. Zip code: 18618-689. Telephone: (+55 14) 3880-0025. Email: selma.matheus@unesp.br.

Abstract

Peripheral nerve injuries (PNIs) lead to several morphofunctional and molecular changes, furthermore to an intense immune response and recovery is rarely complete. Alternative methods have been used to potentiate nerve regeneration, such as the heterologous fibrin biopolymer (HFB). This study evaluated the effects of HFB associated with neurorrhaphy on PNI, with emphasis on the microenvironment of the injury and on neuromuscular interaction. Forty Wistar rats (CEUA/IBB/Unesp: 1177/2019) were distributed into 4 groups (n=10/group). In the Control group (C), the location of the nerve was performed. In the Denervated group (D), neurotmesis and 6 mm gap removal, inversion of the stumps and fixation in the adjacent musculature. In the Suture group (S), neurotmesis followed by neurorrhaphy. In the Suture + HFB group (SB), neurotmesis followed by neurorrhaphy and added HFB. The results showed that the SB group was the only one similar or closer to C group, regarding the number of axons at 7 days; and the number, area and density of blood vessels, angulation and Feret angle of the NMJs, number of central nuclei of the muscle fibers and quantification of connective tissue at 30 days. At 7 days there was an increase in the nerve area, number and area of blood vessels, in the SB group. Still in the SB group there was also an increase in the macrophage area compared to all other groups. This result demonstrate the potential of HFB in accelerating nerve regeneration, inducing angiogenesis, potentiating the immune response, preventing severe muscle degeneration and helping the NMJs return to their normal pattern and therefore is beneficial in PNIs treatment.

Keywords: Fibrin biopolymer; Immune response; Macrophages; Neuromuscular interaction; Neurorrhaphy; Nerve regeneration; Peripheral nerve injury.

1. Introduction

Due to their high incidence, peripheral nerve injuries (PNIs) are considered a common clinical scenario (Jones *et al.*, 2016) that can affect mobility and sensations and also result in lifelong disabilities. (Hussain *et al.*, 2020).

After an PNI a series of degenerative processes occur, which result in the proliferation of Schwann cells and in the activation and attraction of macrophages to the microenvironment of the injury, which phagocytize the myelin (myelinophagy) and axonal debris (Gaudet *et al.*, 2011; Cartarozzi *et al.*, 2015).

Macrophages exhibit two contrasting functional phenotypes, M1 and M2, this phenotypic process represents the extremes of the dynamically changing state of these cells. The M1 phenotype (pro-inflammatory) has classic activation, which occurs after an injury or infection by harmful agents, such as microbial products or pro-inflammatory cytokines. They are also characterized by the production of pro-inflammatory cytokines and release of interleukins. The M2 macrophages (anti-inflammatory), on the other hand, are activated by an alternative route and are predominant in the healing phase, without the prevalence of infection. Thus, they protect adjacent cells, promoting angiogenesis and healing process, that it is associated with tissue remodeling (Saqib *et al.*, 2018; Zigmond e Echevarria, 2019).

The PNIs results in impairment of the neuromuscular interaction, also causing damage to innervated muscle and the associated neuromuscular junctions (NMJs). It leads to several morphofunctional and molecular changes (Leite *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2020).

End-to-end neurorrhaphy is the technique that is most used for the peripheral nerve repair (Wu *et al.*, 2014). However, this surgical treatment does not always restore muscle strength and dexterity prior to the injury, resulting in only around 51% of functional recovery after neurorrhaphy (Sakuma *et al.*, 2016).

In recent years, new approaches have been used in order to promote a greater ability of the axons to restore the injured area and improve nerve repair. These include the use of adjuvants (Hussain *et al.*, 2020).

The heterologous fibrin biopolymer (HFB) is a special adjuvants that was developed by the Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP) of the São Paulo State University (Unesp), Botucatu Campus, São Paulo, Brazil. It was produced from the protein/enzyme gyroxin, a thrombin-like serine protease

extracted from rattlesnake venom (*Crotalus durissus terrificus*); and fibrinogen and other blood clotting factors from buffaloes (*Bubalus bubalis*). The HFB is a natural, biodegradable and bioabsorbable biopolymer, has great adhesive capacity and does not produce adverse reactions, in addition to being non-toxic (Ferreira *et al.*, 2017; Buchaim *et al.*, 2019).

Due to the absence of human blood, it's considered the only fibrin biopolymer heterologous, and because of that, it's not a transmitter of infectious diseases. Thus it can be used in several surgical procedures such as peripheral nerve repair, reinforcing the action of conventional sutures (neurorrhaphy) (Ferreira, 2014; Ferreira *et al.*, 2017; Buchaim *et al.*, 2019).

Many biomaterials, especially biopolymers, can induce a higher proportion of M2 macrophages, indicating that they can intensify the anti-inflammatory response and facilitate tissue remodeling (Faulk *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2018).

The purpose of this study was to evaluate the effects generated by HFB associated to neurorrhaphy on the microenvironment of the injury and on neuromuscular interaction with emphasis on nerve regeneration and immune response at 7 and 30 days after rat sciatic nerve repair.

2. Material and methods

2.1. Animals

For this study, forty male Wistar rats 90 days old (300 - 400 g) were randomly distributed into 4 experimental groups (n = 10/group): Control (C), Denervated (D), Suture (S) and Suture + HFB (SB).

The animals were euthanized at 2 different periods: at 7 days (n = 5/group) and at 30 days (n = 5/group) after surgery.

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Institute of Biosciences of Botucatu (IBB/Unesp) under protocol number 1177/2019.

2.2. Surgical procedure

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (Dopalen, 90 mg/kg) and Xylazine (Anasedan, 10 mg/kg), followed by an incision in the caudal part of the right pelvic limb and the sciatic nerve was exposed. In C group, the visualization and dissection of the sciatic nerve was performed. In D, S and SB groups, about 3 mm above their trifurcation, a nerve injury was performed by transection (neurotmesis). In D group a 6 mm fragment was removed, the nerve stumps were inverted at 180° and fixed to the subcutaneous tissue. In S and SB groups, after neurotmesis, the nerve stumps were immediately reconnected. In S group was done a suture (end-to-end neurorrhaphy) through epineural anastomosis with 2 simple stitches. In the SB group, suture (end-to-end neurorrhaphy/2 stitches) was followed by the application of 250 µL of HFB, whose components and application formula are contained in their patents (Registration numbers: BR1020140114327 and BR1020140114360) (Ferreira *et al.*, 2017).

At 7 and 30 days after surgery, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (Dopalen, 90 mg/kg) and Xylazine (Anasedan, 10 mg/kg) and submitted to intracardiac perfusion. The perfusion occurred through the left ventricle and the aorta cannulation. A Milan peristaltic metering pump was used, first with PBS (phosphate buffered saline) at 0.1 M and later with paraformaldehyde 4%, both at a flow of 30 mL/min. The right atrium was sectioned close to the right auricle to leakage blood and excess fluids. Then, the right sciatic

nerves and soleus muscles were collected, fixed, and prepared according to the analysis protocols below.

2.3. Morphological and morphometric analysis of the sciatic nerve

The distal nerve stumps after fixation in Karnovsky's solution (2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1M PBS, pH 7.4) were included in Histo-resin. The sections (2 μ m) were stained with osmium tetroxide and toluidine blue and photographed using the Olympus Bx41 image analyzer (SC30 camera). The images were obtained from 5 random fields (400x) and were analyzed using the ImageJ software (v.1.53). The following values were obtained: area and nerve perimeter; number of intact axons, mast cells, blood vessels; area and vascular density (vascular area/nerve area x 100%) and the vascular ratio (number of blood vessels/number of axons).

2.4. Immunostaining and quantification of macrophages

The sciatic nerve fragment from the reconstruction area was fixed in 4% paraformaldehyde for 24h, cryoprotected in sucrose (diluted in 0.1 M PBS) 10%, 20% and 30% for 24h each, soaked in freezing medium (Tissue-Plus[®] OCT Compound, Fisher Healthcare) and it was frozen in N-hexane cooled in liquid nitrogen. After this the fragments were sectioned longitudinally (12 μ m) in a cryostat and the sections fixed on silanized slides. Then, the sections were washed with 0.1 M PBS (3 x 5 min), incubated in 4% Triton[®] X-100 (TX-100) (diluted in 0.1 M PBS) for 1h, blocked with BSA 3 % (diluted in 0.1 M PBS + TX-100 2%) for 1h. All antibodies used were diluted in incubation solution (PBS 0.1 M + BSA 1% + TX-100 0.2%). The CD206/mannose receptors (M2 macrophages) were immunostained by overnight incubation at 4 °C with anti-CD206 antibody (anti-mannose receptor - ab64693) (1:200). The following sections were washed with 0.1 M PBS (3 x 5min) and incubated with secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (ab150077) (1:600) for 1h at room temperature. Afterwards, the sections were washed in 0.1 M PBS (3 x 10min) and the slides were mounted using VECTASHIELD[®] with DAPI, and were photographed in an inverted fluorescence microscope. Quantification was performed using the relative area (%), obtained using the Threshold tool of the ImageJ software (v.1.53).

2.5. Analysis of muscle fibers and quantification of connective tissue

The ends (proximal and distal extremities) of the soleus muscles were fixed in 10% buffered formalin (24 h), washed in water (48 h), included in Paraplast®, sectioned in a microtome (4 µm) and 2 slides were made. Each one of them was submitted to Hematoxylin and Eosin (HE) and Masson's Trichrome staining. The prepared slides were photographed (200x) using an Olympus Bx41 microscope (SC30 camera).

2.5.1. Morphological and morphometric analysis of muscle fibers

The slides stained with Hematoxylin and Eosin (HE) was used for selected 3 to 4 random fields (around 200 muscle fibers) (Leite *et al.*, 2019). The area, perimeter, maximum and minimum diameter, angulation, circularity and number of central nuclei were analyzed using ImageJ software (v.1.53).

2.5.2. Quantification of connective tissue

The slides were subjected to Masson's Trichrome staining, where the connective tissue was stained in green and the muscle fibers in red. The quantification of connective tissue was performed using the absolute area and percentage obtained through the ImageJ software (v.1.53), where the green areas were automatically detected, using the software's Threshold tool.

2.6. Morphological and morphometric analysis of neuromuscular junction

The middle third of the soleus muscles (the motor point) were fixed in Karnovsky's solution. Longitudinal sections were performed using a metal sheet and then submitted to a unspecific esterase reaction to mark the NMJs (Lehrer e Ornstein, 1959). Photomicrography was performed on an Olympus Bx41 image analyzer (SC30 camera). The images of fifty NMJs were used for area, perimeter, maximum and minimum diameter, angulation, Feret diameter, Feret angle and minimum Feret morphometric analysis. The measurements were analyzed with with ImageJ software (v.1.53).

2.7. Statistical analysis

The variables of area and perimeter of the nerve and parameters related to NMJs morphometry were analyzed by the One-Way ANOVA test followed by post-test of multiple comparisons of Bonferroni (Johnson e Wichern, 2014) and the values expressed as mean $\pm$ S.E.M. The parameters related to muscle fiber morphometry and quantification of connective tissue and macrophages were analyzed by the One-Way ANOVA test followed by post-test of multiple comparisons of Tukey (Zar, 2009) and the values expressed as mean $\pm$ S.E.M. The vascular area and vascular density were analyzed by the One-Way MANOVA test followed by post-test of multiple comparisons of Bonferroni (Johnson e Wichern, 2014) and the values expressed as mean $\pm$ S.E.M. The variables of number of axons, number of blood vessels, number of mast cells, vascular ratio (n of vessels/n of axons) and number of central nuclei were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by post-test of multiple comparisons of Dunn (Zar, 2009) and the values expressed as median (minimum; maximum ranges). All data were considered using the 5% significance level ($p \leq 0.05$).

3. Results

3.1. Fibrin biopolymer accelerates nerve regeneration and induces angiogenesis

In both periods C group presented morphology within normal standards, with intact axons and myelin sheaths and in regular shapes (Fig. 1A, a).

In D group at 7 days some degenerated nerve fibers and others in the beginning of a Wallerian degeneration process were observed, in which possible to observe changes in the myelin sheath and amorphous axons, making it difficult to differentiate between axon and sheath (Fig. 1B). At 30 days only degenerated fibers were identified with amorphous structures and no myelin sheath. (Fig. 1b).

In S and SB groups at 7 days it was possible to identify intact axons, some of a lesser degenerative degree, when compared to D group, although the fibers appeared to have smaller and more irregular aspects when compared to C group (Fig. 1A-D). In the period of 30 days in S and SB groups some intact axons were observed, but with a smaller and deformed aspect when compared to C group (Fig. 1a, c, d).

In both periods it was possible to observe a greater amount of blood vessels in the SB group, compared to the other experimental groups (Fig. 1D, d).

The analysis revealed at 7 days that the number of intact axons, in D and S groups had values similar to each other and lowers than C and SB groups. While the SB group showed values similar to the C group and higher than the other groups. At 30 days, the injured groups (D, S and SB) presented values similar to each other and lower than group C (Table 1).

Regarding vascular parameters at 7 days, the SB group presented the highest values for the number of blood vessels and vascular area. These values were different from all other groups, which were similar to each other. Vascular density showed no difference between groups. At 30 days, the number of blood vessels in the SB group was like C group and different from the other groups, which were similar to each other. In relation to vascular area and density, the SB group was also like the C group and different from the other groups, however, the D and S groups also did not differ from the C group, being still similar to each other. In both periods there was no difference between the groups regarding to the vascular ratio (number of vessels per axon) (Table 1).

At 7 days the nerve area of the SB group showed the highest values, differing from the other groups, which were similar to each other. At 30 days there was no difference between the groups (Table 1).

In both periods, the nerve perimeter and the number of mast cells did not differ between groups (Table 1).

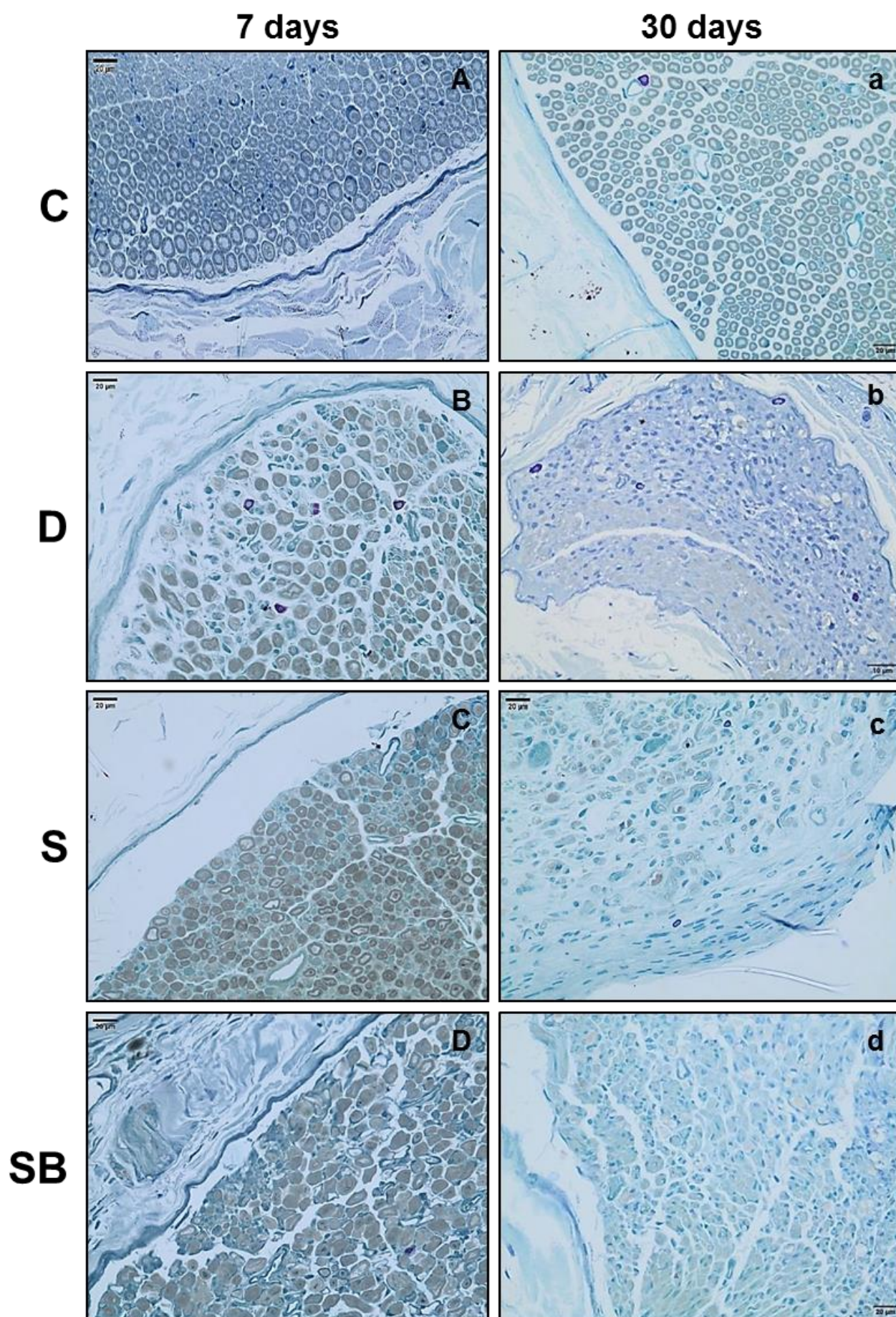


Figure 1. Photomicrographs of cross sections of the sciatic nerve from all experimental groups at the 7 (A-D) and 30 days (a-d). Osmium tetroxide and toluidine blue stained. Conventional light microscope (400X). Group C (Aa); Group D (Bb); Group S (Cc); Group SB (Dd).

Table 1. Assessment of morphometric nerve parameters

Parameters	Experimental groups (n = 10/group)			
	C	D	S	SB
7 days (n = 5)				
¹ Number of axons	3845 (2228; 4344) b	1165 (88; 2503) a	1868 (1380; 3890) a	4009 (1864; 4594) b
¹ Number of blood vessels	8 (5; 18) a	8 (0;15) a	11 (7; 22) a	26 (8; 34) b
² Vascular area (μm^2)	1423 $\pm$ 257 a	1376 $\pm$ 529 a	1962 $\pm$ 134 a	4210 $\pm$ 697 b
² Vascular density (%)	0,4678 $\pm$ 0,098	0,4288 $\pm$ 0,178	0,7648 $\pm$ 0,096	0,8578 $\pm$ 0,130
¹ Vascular ratio (n of vessels / n of axons) $\times 10^2$	0.359 (0.170; 0.630)	0.599 (0.000; 0.798)	0.557 (0.507; 0.761)	0.609 (0.199; 2.019)
³ Nerve area (mm^2)	0.322 $\pm$ 0.045 a	0.251 $\pm$ 0.074 a	0.264 $\pm$ 0.022 a	0.623 $\pm$ 0.116 b
³ Nerve perimeter (mm^2)	2.400 $\pm$ 0.182	2.426 $\pm$ 0.467	2.609 $\pm$ 0.494	3.328 $\pm$ 0.350
¹ Number of mast cells	3 (1; 6)	2 (1; 8)	2 (0; 9)	5 (2; 7)
30 days (n = 5)				
¹ Number of axons	4326 (3128; 6108) b	105 (49; 174) a	186 (29; 1948) a	462 (123; 3835) a
¹ Number of blood vessels	14 (3; 36) b	3 (3; 4) a	6 (5;14) a	15 (11; 26) b
² Vascular area (μm^2)	3325 $\pm$ 1126 ab	457.3 $\pm$ 169 a	1393 $\pm$ 393 a	4877 $\pm$ 988 b
² Vascular density (%)	0.5648 $\pm$ 0.195 ab	0.2138 $\pm$ 0.09 a	0.3368 $\pm$ 0.088 a	1.172 $\pm$ 0.260 b
¹ Vascular ratio (n of vessels / n of axons) $\times 10^2$	0.2312 (0.192; 1.119)	4.762 (2.857; 6.897)	3.763 (0.719; 17.240)	4.546 (2.814; 21.140)
³ Nerve area (mm^2)	0.5028 $\pm$ 0.029	0.3834 $\pm$ 0.115	0.4104 $\pm$ 0.085	0.4614 $\pm$ 0.119
³ Nerve perimeter (mm^2)	2.677 $\pm$ 0.068	2.517 $\pm$ 0.451	2.556 $\pm$ 0.296	2.663 $\pm$ 0.324
¹ Number of mast cells	3 (1; 7)	4 (0; 6)	2 (0; 5)	6 (2; 8)

¹Values expressed as median (minimum; maximum ranges). Analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by post-test of multiple comparisons of Dunn. ²Values expressed as mean $\pm$ S.E.M. Analyzed by the One-Way MANOVA test followed by post-test of multiple comparisons of Bonferroni. ³Values expressed as mean $\pm$ S.E.M. Analyzed by the One-Way ANOVA test followed by post-test of multiple comparisons of Bonferroni. ^{ab}Different letters indicate statistically significant alterations among experimental groups ($p < 0.05$).

3.2. Fibrin biopolymer soothe muscular degeneration

In general, no morphological difference was observed between the experimental groups at 7 days. The muscle fibers showed polygonal-shaped with peripheral nuclei, and a small amount of extracellular matrix, what characteristics is related to normality (Fig. 2A-D, 3A-D). The same observations were present in C group at 30 days (Fig. 2a).

At 30 days, D group presented clusters of small muscle fibers, some with a rounded shape and others with central nuclei, in addition to a large amount of extracellular matrix (Figs 2b, 3b). An intermediate morphology was observed in S and SB groups, with some fibers in polygonal shape and others rounded, some central and others peripheral nuclei and moderate amount of connective tissue. Furthermore, the S group seems to have a greater amount of extracellular matrix when compared to the SB group, especially in the perimysium region and around the blood vessels (Fig. 2c, d; 3c, d).

In addition, the injured groups (D, S and SB) at 30-day showed a large number of nuclei throughout their muscle extension, it is a characteristic of a diffuse inflammatory infiltrate (Fig. 2b, c, d). However, the SB group appears to have a smaller amount of nuclei, but still evident when compared to the other injured groups (Fig. 2d).

The morphometric analysis showed at 7 days no difference among the groups, in relation to the area, perimeter, maximum diameter, angulation, circularity and number of central nuclei. The analysis of the minimum diameter showed lower values in the injured groups compared to C group, which were like each other (Table 2).

At 30 days, the area, perimeter, maximum diameter and minimum diameter on the injured groups presented lower values when compared to C group, being still similar to each other. There was no difference among the groups regarding to circularity and angulation (Table 2).

The score of central nuclei showed higher values in D group when compared to C and SB groups and it was like S group. On the other hand, the SB group, showed a similar result to C and S groups, and different from D group (Table 2).

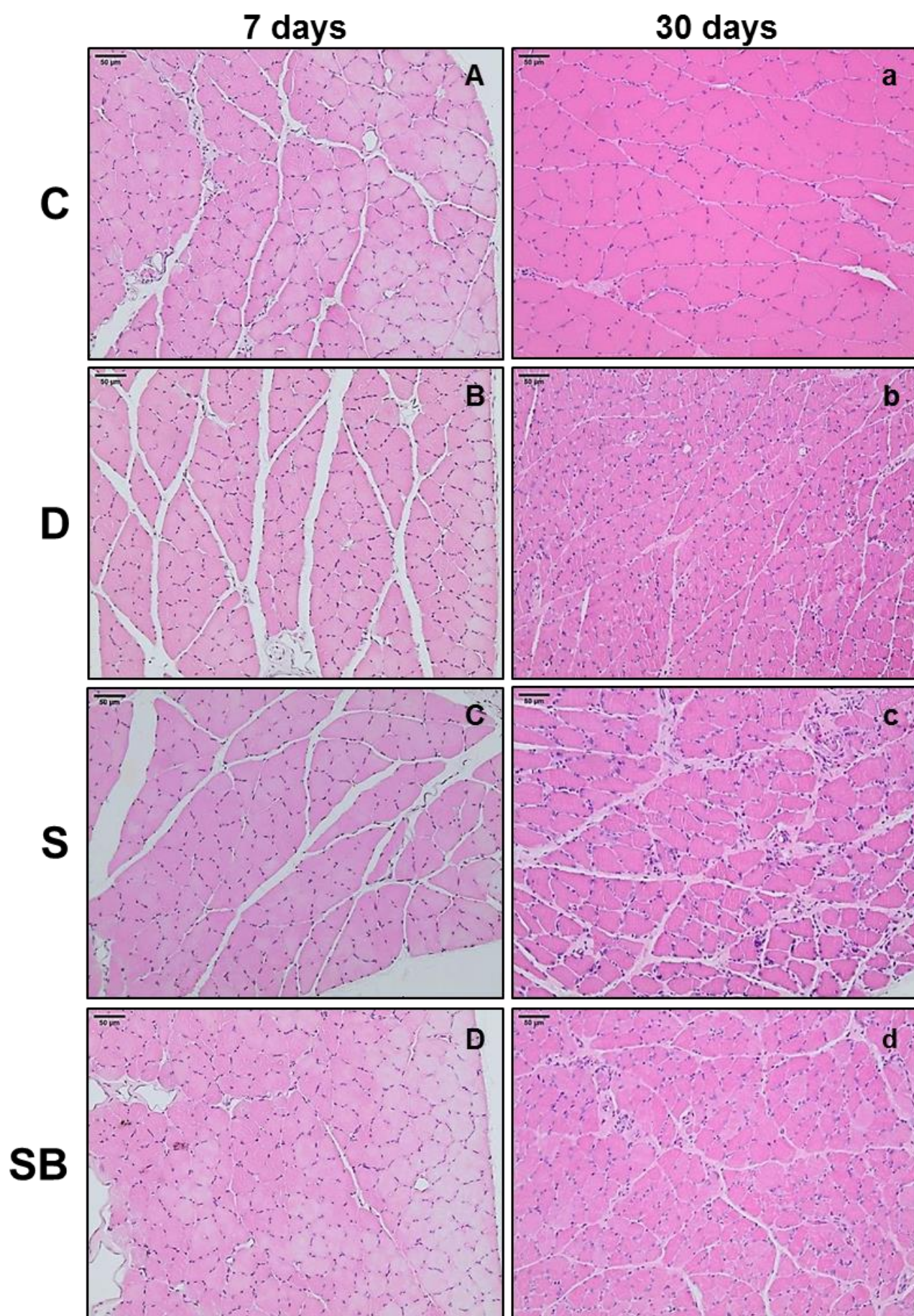


Figure 2: Photomicrographs of cross sections of the soleus muscle of all experimental groups at the 7 (A-D) and 30 days (a-d). Hematoxylin and Eosin (HE). Conventional light microscope. Group C (Aa), Group D (Bb), Group S (Cc) and Group SB (Dd).

Table 2. Assessment of morphometric muscle fiber parameters

Parameters	Experimental groups (n = 10/group)			
	C	D	S	SB
7 days (n = 5)				
¹ Area of muscle fiber (μm^2)	1772 $\pm$ 85.94	1424 $\pm$ 241.3	1308 $\pm$ 47.2	1241 $\pm$ 55.64
¹ Perimeter of muscle fiber (μm)	157.8 $\pm$ 3.563	142.8 $\pm$ 13.34	136.7 $\pm$ 2.434	133.4 $\pm$ 2.429
¹ Maximum diameter (μm)	53.95 $\pm$ 1.192	50.61 $\pm$ 5.672	47.02 $\pm$ 0.812	45.92 $\pm$ 0.989
¹ Minimum diameter (μm)	41.35 $\pm$ 1.116 b	34.74 $\pm$ 2.316 a	35.2 $\pm$ 0.81 a	34.13 $\pm$ 0.92 a
¹ Angulation ($^\circ$)	88.43 $\pm$ 2.767	85.39 $\pm$ 4.076	92.84 $\pm$ 4.771	88.24 $\pm$ 2.38
¹ Circularity	0.882 $\pm$ 0.006	0.851 $\pm$ 0.019	0.873 $\pm$ 0.006	0.866 $\pm$ 0.012
² Number of central nuclei	3 (1; 7)	9 (3; 12)	7 (3; 23)	7 (2; 10)
30 days (n = 5)				
¹ Area of muscle fiber (μm^2)	1753 $\pm$ 110.5 b	616.6 $\pm$ 83.27 a	846.9 $\pm$ 100.8 a	743.6 $\pm$ 69.29 a
¹ Perimeter of muscle fiber (μm)	173.5 $\pm$ 6.426 b	102 $\pm$ 6.501 a	118.5 $\pm$ 6.413 a	110.6 $\pm$ 4.856 a
¹ Maximum diameter (μm)	60.08 $\pm$ 2.274 b	35.62 $\pm$ 2.347 a	41.91 $\pm$ 2.263 a	39.72 $\pm$ 1.926 a
¹ Minimum diameter (μm)	36.91 $\pm$ 1.208 b	21.19 $\pm$ 1.663 a	25.01 $\pm$ 1.766 a	23.23 $\pm$ 1.066 a
¹ Angulation ($^\circ$)	91.5 $\pm$ 3.733	87.19 $\pm$ 5.025	91.15 $\pm$ 3.834	85.67 $\pm$ 4.704
¹ Circularity	0.722 $\pm$ 0.007	0.710 $\pm$ 0.016	0.728 $\pm$ 0.015	0.739 $\pm$ 0.009
² Number of central nuclei	0 (0; 7) a	9 (8; 13) c	8 (6; 13) bc	4 (3; 8) ab

¹Values expressed as mean $\pm$ S.E.M. Analyzed by the One-Way ANOVA test followed by post-test of multiple comparisons of Tukey.

²Values expressed as median (minimum; maximum ranges). Analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by post-test of multiple comparisons of Dunn. ^{abc} Different letters indicate statistically significant alterations among experimental groups ($p < 0.05$).

3.3. Fibrin biopolymer reduces the amount of connective tissue

At 7 days, all the groups did not differ regarding to the percentage of the soleus muscle connective tissue area (Fig. 3E).

The analysis at 30 days showed that D and S groups had similar values to each other and higher than compared to the other two groups (Fig 3E). The SB group was different from all the other groups, presenting intermediate values, lower than the D and S groups, and higher than the C group (Fig 3E).

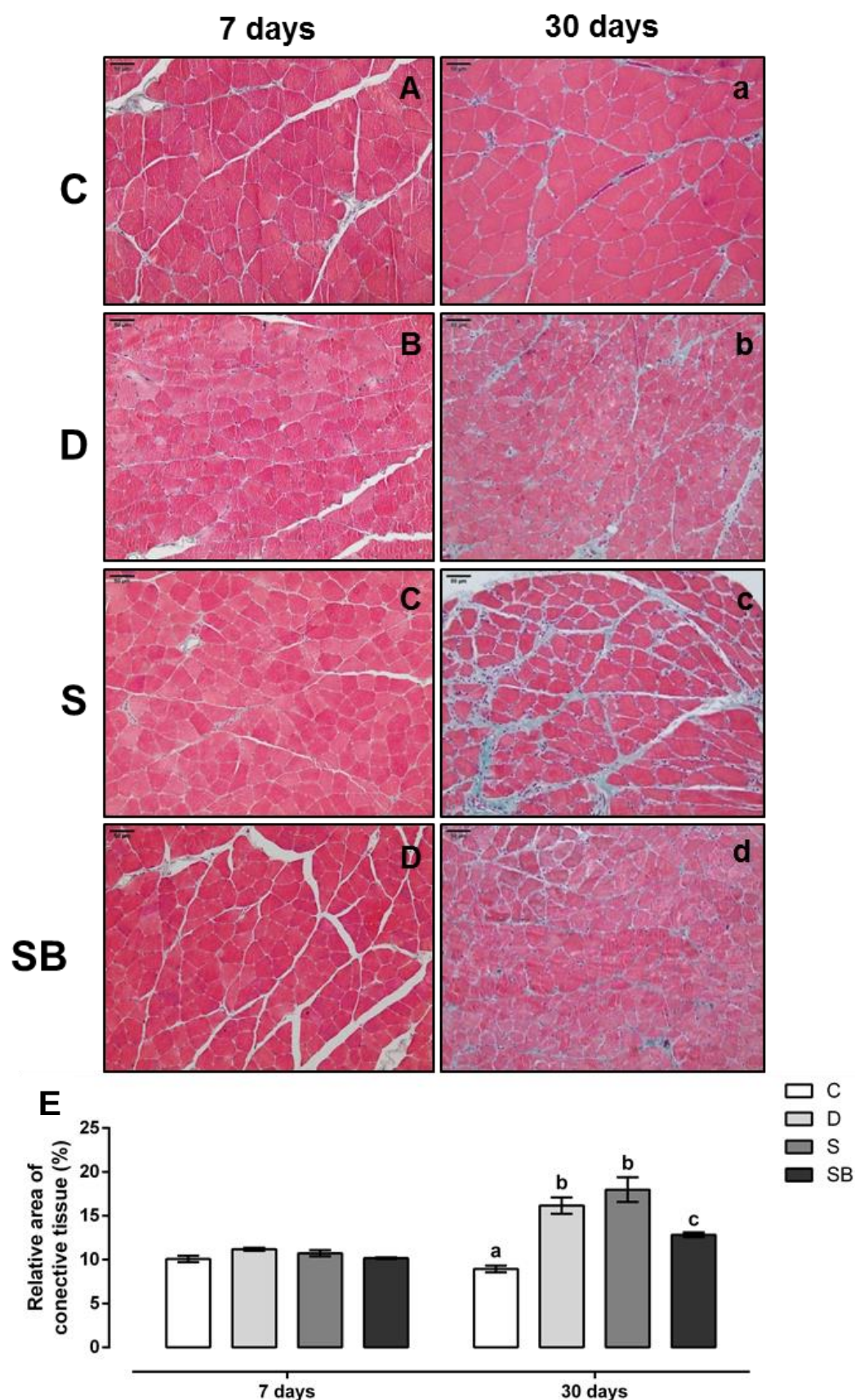


Figure 3. Photomicrographs of cross sections of the soleus muscle of all experimental groups at 7 (A-D) and 30 days (a-d). Masson's Trichrome. Conventional light microscope. Group C (Aa), Group D (Bb), Group S (Cc) and Group SB (Dd). E: Graphs of the connective tissue relative area (percentage) in all experimental groups. Values expressed as mean and S.E.M, and evaluated by the ANOVA test complemented by Tukey's test for multiple comparisons ($p > 0.05$). Different letters indicate statistically significant variation ($p < 0.05$) and equal letters indicate non-significant variation ($p > 0.05$).

3.4. Fibrin biopolymer helps in the morphological recovery of neuromuscular junctions

No morphological difference was observed at 7 days among the experimental groups. It is demonstrating characteristics close to normality, which the NMJs were aligned to the longest axis of the muscle fibers, with distribution restricted to the middle third of the muscle and its appearance was like a pretzel (Fig. 4 A-D). The same was observed in C group at 30 days (Fig. 4a).

The 30 days analysis showed NMJs distributed beyond the middle third, and with a compact, flattened and elongated appearance (Fig 4b) in the D group. The S and SB groups presented intermediate morphology to the previous ones, with NMJs distribution beyond the muscle middle third of the muscle. Their appearance slightly closer to normality, with a more circular and less flattened shape, mainly evidenced in the SB group (Fig. 4c, d).

The morphometric analysis showed no difference among all the groups at 7-day (Table 3).

At 30 days the area, perimeter, minimum diameter and minimum Feret of the injured groups (D, S and SB) were like each other and smaller than C group (Table 3).

Regarding to the NMJ angulation, the D and S groups had values like each other, and lower than the C group. The SB group showed similar values to the C group and it higher than the S group. However, the SB group did not differ from the D group. On the other hand, the analysis of the Feret angle showed that D and S groups also presented similar results to each other and smaller than C group. The SB group was the only group that presented the values as like C group, and D and S groups too (Table 3).

All the groups did not differ regarding maximum diameter and Feret diameter at 30 days (Table 3).

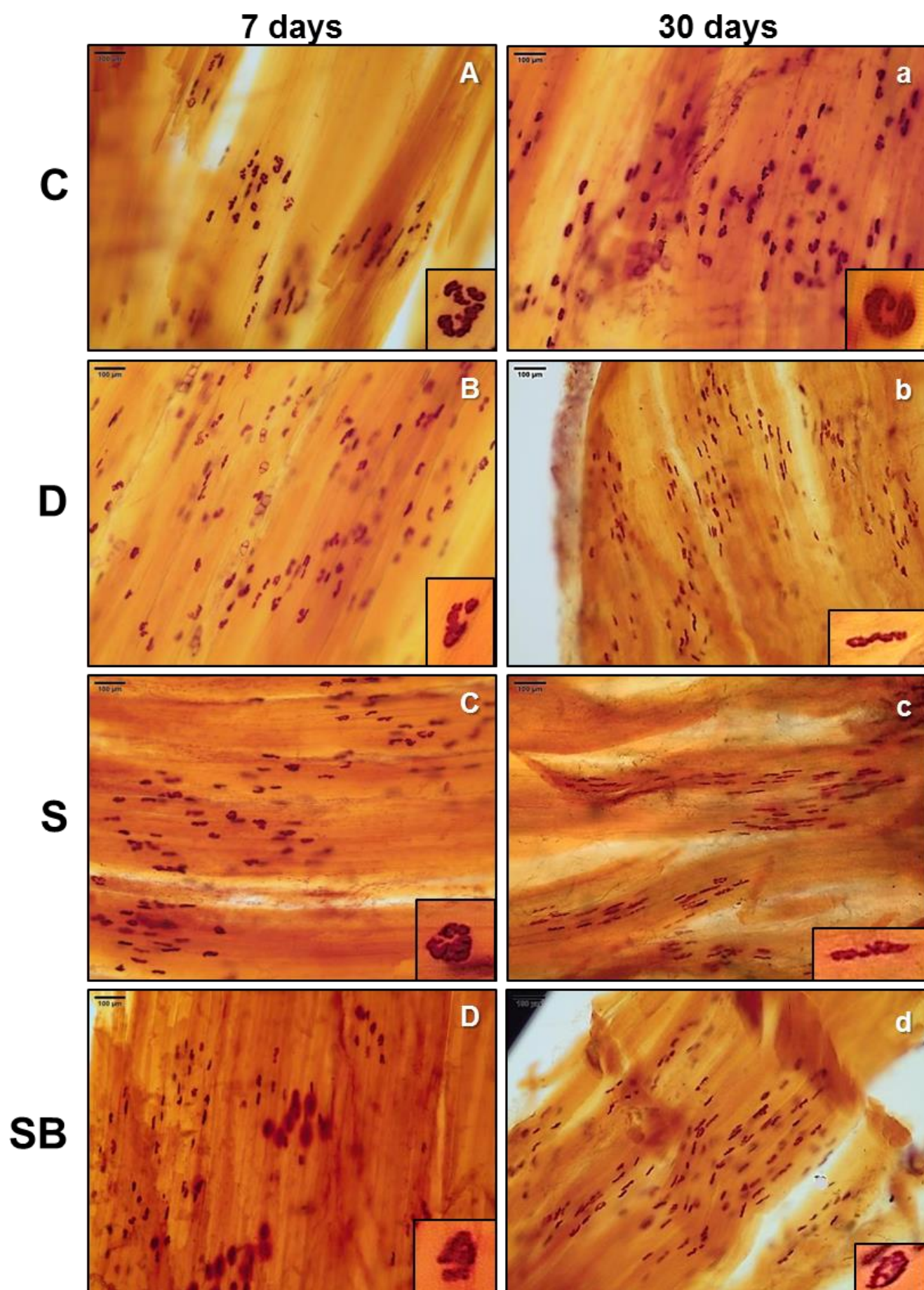


Figure 4. Photomicrographs of the soleus muscle longitudinal sections in all experimental groups at 7 (A-D) and 30 days (a-d). Conventional light microscope (100X). Unspecific esterase reaction. Insert: details of NMJs (400X). Group C (Aa), Group D (Bb), Group S (Cc) and Group SB (Dd).

Table 3. Assessment of morphometric neuromuscular junction (NMJ) parameters

Parameters	Experimental groups (n = 10/group)			
	C	D	S	SB
7 days (n = 5)				
Area of NMJ (μm^2)	418.4 $\pm$ 36.14	311.7 $\pm$ 35.96	348.3 $\pm$ 23.74	375 $\pm$ 51.28
Perimeter of NMJ (μm^2)	117.7 $\pm$ 6.44	93.29 $\pm$ 6.87	106.6 $\pm$ 4.01	106.3 $\pm$ 5.25
Minimum diameter (μm)	13.35 $\pm$ 0.44	11.29 $\pm$ 0.83	11.63 $\pm$ 0.49	11.87 $\pm$ 1.1
Minimum Feret (μm)	16.06 $\pm$ 0.57	12.99 $\pm$ 0.85	13.64 $\pm$ 0.53	13.8 $\pm$ 1.09
Angulation ($^\circ$)	86 $\pm$ 13.57	74.32 $\pm$ 14.41	73.36 $\pm$ 15.03	76.06 $\pm$ 11.26
Feret angle ($^\circ$)	85.37 $\pm$ 13.52	74.43 $\pm$ 14.4	74.72 $\pm$ 16	79.96 $\pm$ 8.75
Maximum diameter (μm)	39.19 $\pm$ 2.5	34.55 $\pm$ 2.18	37.66 $\pm$ 1.89	40.61 $\pm$ 2.5
Feret diameter (μm)	41.27 $\pm$ 2.56	35.51 $\pm$ 2.31	39.28 $\pm$ 1.77	41.66 $\pm$ 2.37
30 days (n = 5)				
Area of NMJ (μm^2)	446.5 $\pm$ 26.08 b	212.6 $\pm$ 20.53 a	229.1 $\pm$ 11.5 a	234.6 $\pm$ 25.83 a
Perimeter of NMJ (μm^2)	118.3 $\pm$ 2.61 b	84.18 $\pm$ 6.94 a	92.69 $\pm$ 3 a	93.35 $\pm$ 7.38 a
Minimum diameter (μm)	13.76 $\pm$ 0.79 b	7.308 $\pm$ 0.44 a	8.172 $\pm$ 0.33 a	8.73 $\pm$ 0.4 a
Minimum Feret (μm)	16.32 $\pm$ 0.88 b	8.86 $\pm$ 0.48 a	10.03 $\pm$ 0.3 a	10.52 $\pm$ 0.42 a
Angulation ($^\circ$)	104 $\pm$ 5.96 c	70.96 $\pm$ 10.69 ab	51.73 $\pm$ 8.13 a	87.41 $\pm$ 3.39 bc
Feret angle ($^\circ$)	103 $\pm$ 6.03 b	70.72 $\pm$ 10.66 a	52.82 $\pm$ 9.43 a	87.13 $\pm$ 3.65 ab
Maximum diameter (μm)	41.62 $\pm$ 1.28	33.77 $\pm$ 2.91	34.63 $\pm$ 0.76	36.5 $\pm$ 2.89
Feret diameter (μm)	43.25 $\pm$ 1.06	34.62 $\pm$ 2.98	36.31 $\pm$ 0.71	37.75 $\pm$ 2.82

Values expressed as mean $\pm$ S.E.M. Analyzed by the One-Way ANOVA test followed by post-test of multiple comparisons of Bonferroni. ^{abc}Different letters indicate statistically significant alterations among experimental groups ($p < 0.01$).

3.5. Fibrin biopolymer potentiates the immune response

The SB group showed greater immunostaining for CD206/mannose receptor (M2 macrophages) in both 7- and 30-days analysis. An intermediate immunostaining was observed in D and S groups, that it was lower in C group (Fig. 5A-D, a-d). In this group (C), the immunostaining was concentrated in the nerve periphery (Fig 5A, a), while in the other groups it was possible to identify beyond the periphery also in more central regions, mainly around the blood vessels (Fig 5B-D, b-d).

In relation to the relative area of immunostaining in both periods, the SB group presented the highest values. Groups S and D were equal with intermediate values, but higher than C and lower than SB (Fig 5E).

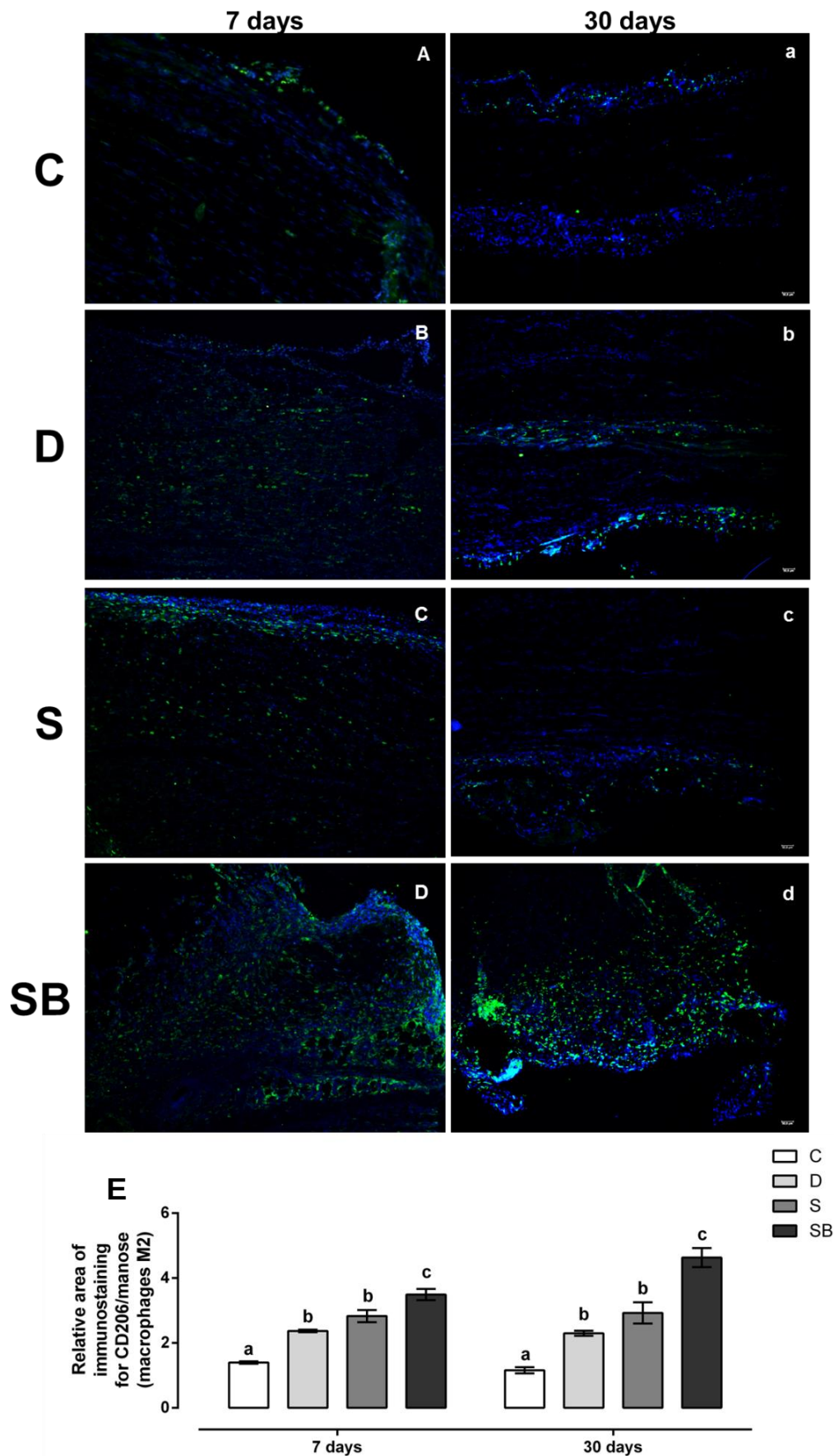


Figure 5. Photomicrographs of sciatic nerve longitudinal sections immunostained with anti-CD206 (M2 macrophages) in all experimental groups at 7 (A-D) and 30 days (a-d). CD206+ macrophages labelled in green and unspecific nuclei in blue. Inverted fluorescence microscope (100X). Group C (A, a), Group D (B, b), Group S (C, c) and Group SB (D, d). E: Graphs of the mean and S.E.M. of relative area of macrophages M2 (CD206+) in all experimental groups. ANOVA test, complemented with Tukey's test. Different letters indicate statistically significant variation ($p < 0.05$) and equal letters indicate non-significant variation ($p > 0.05$).

4. Discussion

The PNI model used in this study was neurotmesis followed by reconstruction through end-to-end neurorrhaphy associated or not with HFB, seeking a new approach to peripheral nerve repair in its most severe degree.

In group D, the removal of a nerve fragment and fixation of the stumps in the subcutaneous tissue were performed in order to avoid spontaneous regeneration (Gaudet *et al.*, 2011).

The experimental periods of 7 and 30 days were chosen in order to observe the action of HFB in the degeneration and regeneration phases, as well as the transition between these processes (Zigmond e Echevarria, 2019).

Morphological changes were observed in the nerve of injured groups (D, S and SB) in both experimental periods. Several evidences of degeneration were present, mainly in D group. In the injured groups, amorphous axons without myelin sheath and with irregular shapes were found, as well as residues from the disintegration of axonal cytoskeleton elements, associated with myelin degradation and with phagocytic process intense. These characteristics is related to the Wallerian degeneration (Gaudet *et al.*, 2011). In S and SB groups, axons with intact myelin sheaths were observed, possibly undergoing remyelination. It is an indicating of the initial phase in regenerative process and includes a transition between degeneration and regeneration (Raducan *et al.*, 2013).

The nerve analysis showed at 7 days that the SB group presented a greater number of axons compared to the S and D groups, like the C group, suggestive of a pro-regenerative effect at the injury site. An accentuated nerve regeneration in the SB group can be explained due to the potentiation of the immune response, that was confirmed by the increase of area CD206 (M2). Consequently an increase in the number of macrophages and other inflammatory cells that will act both in degeneration and in regeneration process, accelerating them, which are sequential and interdependent (Gaudet *et al.*, 2011). Outstanding is the action of macrophages and Schwann cells, which performance are clean damaged axons and myelin. These cells are also benefit the regenerative growth cone formation towards the distal stump of the nerve. It results in a regenerative process potentiation that occurs after the Wallerian degeneration (Cunningham *et al.*, 2020).

The increase area of CD206 (M2 macrophages) the SB group at 7 days corroborates to optimize the inflammatory immune response, which help the development of a pro-regenerative microenvironment, as soon as there is greater activation of immune signals, cytokines and factors of growth as IL-10 and TGF- β (Cheepudomwit *et al.*, 2008; Barrette *et al.*, 2010). These signals benefit the active and direct recruitment of more immune cells, such as mast cells and macrophages, causing an even more present and effector immune response during the Wallerian degeneration. All this process causes a neurogenic and protective inflammation that contributes to the regeneration (Cámara-Lemarroy *et al.*, 2010).

The SB group at 30 days also showed a higher proportion of CD206 (M2 macrophages) area. Spejo *et al.* (2018) described that HFB can stimulate the recruitment and migration of macrophages, mainly M2. These cells are crucial in the lesion microenvironment, as this phenotype promotes tissue maturation and differentiation and provides trophic support to increase axonal growth (Stratton e Shah, 2016).

In addition, the presence of fibrinogen xenograft and other coagulation factors plus the fibronectin in HFB composition contributes to stimulate the immune response. It include, an expanding of macrophages and anti- and pro-inflammatory factors/cytokines, demonstrating an immunomodulatory and a potential immunogenic effect that inducing inflammation by anti- but also pro-inflammatory mechanisms, which can provide a neuroprotective microenvironment (Spejo *et al.*, 2018). These results suggest that HFB is advantageous for the local microenvironment, during the first days after injury, and it is also a possible accelerating factor in the initial stages of nerve regeneration (Spejo *et al.*, 2018; Leite *et al.*, 2019). However, further studies are needed to support this association.

At 7 days, the SB group had greater vascular area and number of blood vessels in relation to the other groups. While at 30 days, it is the only group to present similar results to the Control, in relation to number of blood vessels. The vascular responses and the revascularization after PNI are enhanced by HFB, promoting angiogenesis (Abbade *et al.*, 2021). These results reinforcing HFB role in the development of a protective and pro-regenerative microenvironment associated with greater vascular potential. The greater vascular supply of newly formed vessels not only contributes to the supply of oxygen and nutrients to the regenerating

nervous tissue, but is also used as a guide for cell migration (Cattin *et al.*, 2015) that promoting axonal growth after injury (Magaz *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2019).

At 30 days after injury, there was a similarity in D, S and SB groups in relation to the axon and mast cells numbers. In this phase, pro- and anti-inflammatory factors are present as soon as the regenerative process is not fully established (Defrancesco-Lisowitz *et al.*, 2015; Zigmond e Echevarria, 2019).

The morphometric results of NMJs at 7 days showed similarity among the groups in all parameters analyzed except for the minimum diameter. It can be explained by the short experimental period. Changes in the morphology of NMJs can be noticed in two weeks after PNI, when the muscle fibers lose contact with the nerve terminal and become completely denervated. Therefore, the motor plates are empty and the NMJs starting their phase of decline and disorganization (Sakakima *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2011).

At 30 days, the analysis of the soleus muscle showed similarity between the injured groups for most of analyzed parameters. However, many nuclei were observed throughout the muscle, that is a characteristic of a diffuse inflammatory infiltrate. After denervation, occurs a muscle fibers degeneration, which over time are replaced by fat and fibrous connective tissue. This makes the muscle progressively refractory to reinnervation (Campbell, 2008). The inflammation is one of the muscle degeneration consequences that leads to a gradual loss of muscle mass resulting in atrophy (Huang *et al.*, 2019). The SB group presented a smaller number of nuclei when compared to other injured groups, consequently a lower degree of inflammation and atrophy.

The satellite cells are myogenic precursors that are present under the basal lamina of muscle. After PNI, occurs their activation, proliferation, fusion and internalization (Carraro *et al.*, 2015). This myonuclei reorganization and centralization is a scoring of disorder, atrophy and degeneration muscle, and its presence was observed in severely atrophic muscle fibers up to 7 months after denervation in rodents (Carraro *et al.*, 2015). After PNI, an increase in connective tissue of the extracellular matrix also occurs in the skeletal muscle, as soon as there is a decrease in the area and volume of muscle fibers. This tissue impairs the capacity for muscle contraction, configuring a picture of fibrosis and atrophy (Muller *et al.*, 2007; Moimas *et al.*, 2013). There was a reduction in connective tissue and in the number of central nuclei in the SB group. These data suggest that HFB accelerated the nerve

regeneration proven by a lower degree of fibrosis (Muller *et al.*, 2007; Tuffaha *et al.*, 2016), inflammation (Huang *et al.*, 2019), and atrophy (Campbell, 2008; Moimas *et al.*, 2013; Carraro *et al.*, 2015).

At 30-day the NMJs showed similar results among D, S and SB groups, in relation to the area, perimeter, minimum diameter and minimum Feret. This also collaborate with the muscle fibers morphometry results. Muscle recovery depends on nerve regeneration and consequently of the motor plates reinnervation. This reinnervation re-establishes itself, at least, after 4 weeks of the nerve injury (Sakakima *et al.*, 2000). Ma *et al.* (2011) also describe that it was only possible to observe motor endplate reinnervation within 5 weeks after transection followed by sciatic nerve reconstruction in mice.

The NMJs do not reach their normality pattern if the reinnervation of the motor plates is not reestablished (Sakakima *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2011). Pinto *et al.* (2020) verified morphological and molecular recovery of NMJs only at 60 days after sciatic nerve reconstruction, when used HFB associated with neurorrhaphy.

However, the SB group showed a partial return of the NMJs to their normal circularity patterns, that it was related with the angulation and Feret angle values. The Feret's measurements are geometric parameters that are very robust against experimental errors, such as three-dimensionality and the orientation of the structure's cutting angle, which is why they are widely used in microscopy for morphometric analysis (Briguet *et al.*, 2004). The Feret angle, mainly, shows the degree of elongation of the delimited area (Briguet *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Ham *et al.*, 2020), thus suggesting that the NMJs were more circular in the SB group, closer to the "pretzel" shape that it is their normal morphological pattern (Marques *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2020).

The results found here complement previous research carried out by our research group, in which HFB associated to neurorrhaphy potentiates axonal regeneration and morphological and molecular recovery of NMJs (Leite *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2020).

This study, through the SB group, showed that the application of the HFB is advantageous. This biopolymer has been shown to have pro-regenerative effects that accelerate nerve regeneration, ability to induce angiogenesis and an immunomodulatory potential that stimulates the immune response in the initial

periods after PNI. It also contributed to the morphological recovery of NMJs and prevented severe muscle degeneration, with lesser degrees of atrophy and fibrosis.

Thus, HFB associated to neurorrhaphy appears as an advantageous new approach to peripheral nerves repair, favoring nerve regeneration, and contributing to the microenvironment of axonal growth.

5. References

- ABBADE, L. P. et al. Treatment of chronic venous ulcers with heterologous fibrin sealant: A phase I/II clinical trial. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 83, 2021. ISSN 1664-3224.
- BARRETTE, B. et al. Transcriptional profiling of the injured sciatic nerve of mice carrying the Wld (S) mutant gene: identification of genes involved in neuroprotection, neuroinflammation, and nerve regeneration. **Brain, behavior, and immunity**, v. 24, n. 8, p. 1254-1267, 2010. ISSN 0889-1591.
- BRIGUET, A. et al. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. **Neuromuscular disorders**, v. 14, n. 10, p. 675-682, 2004. ISSN 0960-8966.
- BUCHAIM, D. V. et al. Unique heterologous fibrin biopolymer with hemostatic, adhesive, sealant, scaffold and drug delivery properties: a systematic review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 2019. ISSN 1678-9199.
- CÁMARA-LEMARROY, C. R.; GUZMÁN-DE LA GARZA, F. J.; FERNÁNDEZ-GARZA, N. E. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 5, p. 314-324, 2010. ISSN 1021-7401.
- CAMPBELL, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clinical neurophysiology**, v. 119, n. 9, p. 1951-1965, 2008. ISSN 1388-2457.
- CARRARO, U. et al. Persistent muscle fiber regeneration in long term denervation. Past, present, future. **European journal of translational myology**, v. 25, n. 2, 2015.
- CARTAROZZI, L. P. et al. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. **Brain research bulletin**, v. 112, p. 14-24, 2015. ISSN 0361-9230.
- CATTIN, A.-L. et al. Macrophage-induced blood vessels guide Schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 1127-1139, 2015. ISSN 0092-8674.
- CHEEPUDOMWIT, T. et al. Comparison of cytokine expression profile during Wallerian degeneration of myelinated and unmyelinated peripheral axons. **Neuroscience letters**, v. 430, n. 3, p. 230-235, 2008. ISSN 0304-3940.
- CRUZ, P. M. R. et al. The neuromuscular junction in health and disease: molecular mechanisms governing synaptic formation and homeostasis. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 13, 2020.
- CUNNINGHAM, M. E. et al. Perisynaptic Schwann cells phagocytose nerve terminal debris in a mouse model of Guillain-Barré syndrome. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 25, n. 2, p. 143-151, 2020. ISSN 1085-9489.
- FAULK, D. M. et al. ECM hydrogel coating mitigates the chronic inflammatory response to polypropylene mesh. **Biomaterials**, v. 35, n. 30, p. 8585-8595, 2014. ISSN 0142-9612.
- FERREIRA, R. S. Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice? **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 31, 2014. ISSN 1678-9199.

- FERREIRA, R. S. et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside—an overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 21, 2017. ISSN 1678-9199.
- GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 110, 2011. ISSN 1742-2094.
- HAM, D. J. et al. The neuromuscular junction is a focal point of mTORC1 signaling in sarcopenia. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2020. ISSN 2041-1723.
- HUANG, Z. et al. Skeletal muscle atrophy was alleviated by salidroside through suppressing oxidative stress and inflammation during denervation. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 997, 2019. ISSN 1663-9812.
- HUSSAIN, G. et al. Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 1, p. 116, 2020.
- JOHNSON, R.; WICHERN, D. **others**, **Applied multivariate statistical analysis, vol. 4:** Prentice-Hall New Jersey 2014.
- JONES, S.; EISENBERG, H. M.; JIA, X. Advances and future applications of augmented peripheral nerve regeneration. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1494, 2016.
- LEHRER, G. M.; ORNSTEIN, L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. **The Journal of Cell Biology**, v. 6, n. 3, p. 399-406, 1959. ISSN 0021-9525.
- LEITE, A. P. S. et al. Heterologous fibrin sealant potentiates axonal regeneration after peripheral nerve injury with reduction in the number of suture points. **Injury**, v. 50, n. 4, p. 834-847, 2019. ISSN 0020-1383.
- LIN, T. et al. Hydrogel derived from porcine decellularized nerve tissue as a promising biomaterial for repairing peripheral nerve defects. **Acta biomaterialia**, v. 73, p. 326-338, 2018. ISSN 1742-7061.
- LU, J. et al. Synergistic effects of dual-presenting VEGF-and BDNF-mimetic peptide epitopes from self-assembling peptide hydrogels on peripheral nerve regeneration. **Nanoscale**, v. 11, n. 42, p. 19943-19958, 2019.
- MA, C. H. E. et al. Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 11, 2011. ISSN 0021-9738.
- MAGAZ, A. et al. Bioactive Silk-Based Nerve Guidance Conduits for Augmenting Peripheral Nerve Repair. **Advanced healthcare materials**, v. 7, n. 23, p. 1800308, 2018. ISSN 2192-2640.
- MARQUES, M. J.; CONCHELLO, J.-A.; LICHTMAN, J. W. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 3663-3675, 2000. ISSN 0270-6474.
- MOIMAS, S. et al. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. **Gene therapy**, v. 20, n. 10, p. 1014, 2013. ISSN 1476-5462.

- MULLER, F. L. et al. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. **American journal of physiology-Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 3, p. R1159-R1168, 2007. ISSN 0363-6119.
- NUNES, L.; PACIORNIK, S.; D'ALMEIDA, J. Evaluation of the damaged area of glass-fiber-reinforced epoxy-matrix composite materials submitted to ballistic impacts. **Composites science and technology**, v. 64, n. 7-8, p. 945-954, 2004. ISSN 0266-3538.
- PINTO, C. G. et al. Heterologous fibrin biopolymer associated to a single suture stitch enables the return of neuromuscular junction to its mature pattern after peripheral nerve injury. **Injury**, 2020. ISSN 0020-1383.
- RADUCAN, A. et al. Morphological and functional aspects of sciatic nerve regeneration after crush injury. **Rom J Morphol Embryol**, v. 54, n. 3 Suppl, p. 735-9, 2013.
- SAKAKIMA, H. et al. Effects of short-term denervation and subsequent reinnervation on motor endplates and the soleus muscle in the rat. **Archives of histology and cytology**, v. 63, n. 5, p. 495-506, 2000. ISSN 0914-9465.
- SAKUMA, M. et al. Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. **European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 3, p. 451-462, 2016. ISSN 1460-9568.
- SAQIB, U. et al. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17937, 2018.
- SPEJO, A. et al. Neuroprotection and immunomodulation following intraspinal axotomy of motoneurons by treatment with adult mesenchymal stem cells. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2018. ISSN 1742-2094.
- STRATTON, J. A.; SHAH, P. T. Macrophage polarization in nerve injury: do Schwann cells play a role? **Neural regeneration research**, v. 11, n. 1, p. 53, 2016.
- TUFFAHA, S. H. et al. Growth hormone therapy accelerates axonal regeneration, promotes motor reinnervation, and reduces muscle atrophy following peripheral nerve injury. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 137, n. 6, p. 1771-1780, 2016. ISSN 0032-1052.
- WOLF, M. T. et al. Macrophage polarization in response to ECM coated polypropylene mesh. **Biomaterials**, v. 35, n. 25, p. 6838-6849, 2014. ISSN 0142-9612.
- WU, P. et al. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. **Neural regeneration research**, v. 9, n. 20, p. 1796, 2014.
- ZAR, J. Biostatistical Analysis, 4th Impression, Dorling Kindersley (India) Pvt. **Ltd., Delhi**, v. 110, p. 92, 2009.
- ZIGMOND, R. E.; ECHEVARRIA, F. D. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. **Progress in neurobiology**, v. 173, p. 102-121, 2019. ISSN 0301-0082.

Anexo

7. ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Reconstrução nervosa via neurorrafia associada ao biopolímero heterólogo de fibrina: avaliação da resposta inflamatória e interação neuromuscular", Protocolo nº **1177-CEUA**, sob a responsabilidade de **Selma Maria Michelin Matheus** e colaboração de **Felipe Cantore Tibúrcio**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	☐ Ensino	☒ Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 27/6/2019	Término: 5/3/2021
Espécie/linhagem:	Rato Wistar	
Nº de animais:	80(-40)	
Peso:	300 a 400g	Idade: 90 dias
Sexo:	macho	
Origem	Biotério Central da Unesp-Câmpus de Botucatu	

Botucatu, 14 de junho de 2019.

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Coordenadora da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Instituto de Biociências da Unesp - Câmpus de Botucatu
Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250 - Distrito de Rubião Júnior - CEP 13618-689 Botucatu/SP Tel 14
3880 0851 mail: secda@ibb.unesp.br