



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

**FACULDADE DE MEDICINA**

**Carina Guidi Pinto**

**Análise dos receptores de acetilcolina e proteínas  
associadas no reparo de nervo periférico após uso de  
selante de fibrina e neurorrafia: estudo experimental em  
ratos**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, como requisito para obtenção do  
título de Doutora em Bases Gerais da  
Cirurgia.

Orientador (a): Profa. Associada Selma Maria Michelin Matheus  
Coorientadora: Profa. Dra. Samara Camaçari de Carvalho

**Botucatu**

**2019**

Carina Guidi Pinto

Análise dos receptores de acetilcolina e proteínas associadas no reparo de nervo periférico após uso de selante de fibrina e neurorrafia: estudo experimental em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, como requisito, para obtenção do título de Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador (a): Profa. Associada Selma Maria Michelin Matheus  
Coorientadora: Profa. Dra. Samara Camaçari de Carvalho

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Pinto, Carina Guidi.

Análise dos receptores de acetilcolina e proteínas associadas no reparo de nervo periférico após uso de selante de fibrina e neurorrafia : estudo experimental em ratos / Carina Guidi Pinto. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Selma Maria Michelin Matheus  
Coorientador: Samara Camaçari de Carvalho  
Capes: 20600003

1. Junção neuromuscular. 2. Adesivo tecidual de fibrina. 3. Nervos periféricos.

Palavras-chave: Junção neuromuscular; Lesão nervosa periférica; Selante de fibrina.

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Silvia e Luiz, que com muito carinho e  
apoio, não mediram esforços para que  
eu chegasse até esta etapa da minha  
vida e que sempre me mostraram que  
as dificuldades aparecem para serem  
superadas.*

## **Agradecimentos**

*Primeiramente agradeço a **Deus**, pelo dom da vida, por me guiar nesta jornada sempre me fortalecendo.*

*A **minha família**, ofereço todas as minhas conquistas. **Meus pais**, meus exemplos de dedicação e amor. A **minha amada irmã, Camila** pelo carinho, por dividir todos os momentos e pela cumplicidade de sempre e a **minha avó Marli**, pelo afeto e preocupação. E aos demais familiares que mesmo com a distância torceram por mim. Amo todos vocês!*

*Ao **Carlos Eduardo**, meu namorado, companheiro, amigo e confidente. Sempre me apoiando, ouvindo, incentivando e ajudando nas realizações dos meus sonhos e objetivos. Muito obrigada, você foi e sempre será fundamental para meu crescimento. Te amo.*

*A minha **orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Selma M. M. Matheus**, muito mais que uma orientadora! Agradeço por toda confiança, dedicação, carinho, profissionalismo e aprendizado, durante estes cinco anos da minha vida acadêmica. Passamos momentos alegres e de muitas risadas, porém alguns momentos tristes e difíceis, mas você sempre esteve junto em todos eles para apoiar e incentivar. Você é um exemplo de pessoa, profissional e pesquisadora. Obrigada por tudo!*

*À minha **co-orientadora, Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Samara C. de Carvalho** pelo carinho, apoio e ensinamento, que mesmo longe esteve presente tornando possível a realização desse trabalho.*

*Ao **professor Dr<sup>o</sup> André LuisFiladelpho**, pelo auxílio com o protocolo cirúrgico deste estudo, sempre com muita paciência e dedicação me ensinado cada etapa, muito obrigada.*

*Ao **CEVAP (UNESP/Botucatu)** por gentilmente ceder o selante de fibrina paraa realização deste trabalho.*

*Ao programa de **Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia**, ao **Instituto de Biociências, da UNESP de Botucatu** e a **Unidade de pesquisa experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNIPEX/FMB)**, pela estrutura e apoio para a realização deste trabalho.*

*Á todos os **professores e funcionários do departamento de Anatomia/IBB** pelo auxílio, companheirismo, incentivo e amizade, durante esses cinco anos.*

*Aos **funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica**, em especial a Shelly e Elton por todo auxílio*

*Aos **funcionários da Unipex**, pelo acompanhamento, ensinamentos e apoio nas cirurgias, em especial ao **Bardella, Zé, Robson, Sílvio e Diego** por todo o cuidado com os animais utilizados neste estudo.*

*A **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos e a **FAPESP(2017-06472-2)** pela concessão de auxílio pesquisa e aos **animais** desse experimento pelas vidas doadas que engrandeceram a ciência.*

*Ao **Professor José Eduardo Corrente** pela realização e ajuda com todas as análises estatísticas.*

*Aos **amigos do laboratório de Anatomia**, pela amizade, apoio, pelo incentivo, dedicação, companheirismo nas horas mais difíceis e pelas risadas nos momentos de alegria. Vocês têm uma contribuição em mais esta etapa vencida.*

*A minha querida **amiga Ana Paula**, pela convivência diária, você foi de extrema importância para a realização deste trabalho e grande exemplo de dedicação, respeito, amizade, simplicidade e profissionalismo. Aprendi muito com você. E também aos **amigos Felipe, Talita e Marília**, que me ouviram, ajudaram e deixaram minha jornada mais leve e divertida. Obrigada pela convivência dentro e fora da UNESP, por todo carinho e atenção! Vocês são muito especiais na minha vida.*

*Aos **membros das bancas de qualificação e defesa** pela disponibilidade em estar presente neste momento e pelas colaborações fundamentais para este trabalho. Muito obrigada.*

*Este momento jamais seria o mesmo sem o apoio e incentivo dos meus colegas, amigos e familiares, que estão presentes, fisicamente ou virtualmente, nos momentos de dificuldades tornando-os mais leves e fazendo os meus dias mais alegres.*

*Um sorriso pode mudar um dia e por isso sou grata a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.*

**MUITO OBRIGADA.**

## *Epígrafe*

*“Sonhar é um dos princípios mais básicos e fundamentais da essência do ser humano, é condição, é imposição.*

*Sonhar é vida e conquistar um sonho é como conquistar um pedaço da vida; é realização e é triunfo!*

*Mas nada disso será possível sem que lutemos por isso, sem que haja persistência, sem que sejamos fiéis aos nossos sonhos e deles nunca desistamos. ”*

*(Professor Galvão)*

## Resumo

As lesões nervosas periféricas (LNPs) levam a uma perda da conexão entre o axônio e o músculo, ocasionando interrupção na transmissão do impulso nervoso e alterações nas junções neuromusculares (JNMs). O reparo das LNPs através da neurografia é um método amplamente utilizado, porém a recuperação tanto morfológica e funcional é incompleta, sendo um desafio para a clínica médica. Diante disso métodos alternativos como uso de selante de fibrina vêm sendo utilizados para minimizar danos e acelerar a recuperação nervosa e muscular, havendo poucas referências em relação às JNMs. O objetivo deste estudo foi verificar se o uso do selante de fibrina associado a um ponto de sutura atinge ou supera os resultados da sutura convencional após LNP com foco nos receptores de acetilcolina (nAChRs) e proteínas associadas às JNMs no músculo sóleo. Foram utilizados 40 ratos Wistar machos adultos (CEUA: 1173/2016), divididos em 4 grupos: Controle-Sham (CS), Controle-Desnervado (CD), Lesão Sutura (LS) e Lesão Sutura + Selante de Fibrina (LSS). No grupo CS foi realizada incisão, afastamento da musculatura e localização do nervo isquiático direito. No grupo CD foi realizada neurotmeze (gap de 6 mm). Nos grupos CD, LS e LSS foi realizada fixação dos cotos na musculatura após a neurotmeze. Após 7 dias foi realizada reconexão dos cotos com três pontos de sutura no grupo LS e no grupo LSS um ponto de sutura foi associada ao selante de fibrina (CEVAP). Após 60 dias os animais foram eutanasiados, os músculos sóleos removidos e analisados através de microscopia confocal para obter a morfologia e morfometria dos nAChRs ( $\alpha$ -bungaratoxina) e a morfologia do terminal nervoso (NF200) e através do Western Blotting para obter a quantificação proteica dos nAChRs ( $\alpha$ 1,  $\epsilon$  e  $\gamma$ ), S100, Agrina, MMP-3, MuSK e Rapsina. A análise qualitativa da microscopia confocal no grupo CS mostrou nAChRs com distribuição compatível com a normalidade com braços contínuos e terminais nervosos íntegros, preservados e sem descontinuidade. No grupo CD foi observado achatamento na placa motora, fragmentação dos nAChRs, com distribuição em “ilhas” e terminais nervosos emaranhados. Nos grupos LS e LSS a morfologia mostrou-se intermediária entre os grupos CS e CD, com terminais nervosos mais delgados. Os dados morfométricos foram compatíveis com a morfologia, nos grupos LS e LSS apresentaram valores intermediários entre os grupos CS e CD e houve aumento da área relativa planar dos grupos LS e LSS, evidenciando uma menor fragmentação dos nAChRs. Os valores encontrados na expressão proteica nos grupos LS e LSS foram semelhantes ao CS. Neste estudo foi observado que após reconstrução nervosa, nos grupos LS e LSS houve um retorno dos nAChRs ao estágio maduro, justificado pela expressão proteica da subunidade  $\epsilon$  (madura). Valores inversos foram encontrados para a subunidade  $\gamma$  (imatura, desnervada). Desse modo pode-se concluir que houve semelhança entre os grupos com reconstrução nervosa evidenciando a recuperação após reconexão dos cotos nervosos, considerando que houve retorno da estrutura morfológica com menor fragmentação dos nAChRs e retorno das proteínas associadas à JNM ao seu padrão maduro e o selante de fibrina com a redução do número de pontos de sutura mostrou-se promissor com um retorno acentuado da subunidade relacionada ao padrão imaturo-desnervado do receptor.

## Abstract

Peripheral nerve lesions (PNLs) lead to a loss of the connection between axons and muscle, resulting in the interruption of the transmission of nerve impulses and alterations in the neuromuscular junctions (NMJs). The repair of PNLs through neurorrhaphy is a widely utilized method, however the recuperation of both morphology and function is incomplete, challenging medical clinic. Thus, alternative methods such as the usage of fibrin sealants have been utilized to minimize damages and accelerate nerve and muscular recuperation, with few references in relation to NMJs. The objective of this study was to verify if the use of fibrin sealants associated to a stitch of suture reaches or surpasses the results of traditional suture after PNLs with focus in the acetylcholine receptors (nAChRs) and proteins associated to the NMJs in the soleus muscle. Forty male adult Wistar rats were utilized (CEUA: 1173/2016), divided into 4 groups: Sham-Control (SC), Denervated-Control (DC), Suture Lesion (SL) and Suture Lesion + Fibrin Sealant (SFS). In SC group, it was performed incision, muscle spacing and identification of the right sciatic nerve. In DC group, it was performed neurotmesis (gap of 6 mm). In DC, SL and SFS groups, it was carried out fixation of stumps on the musculature after neurotmesis. After 7 days the reconnection of the stumps with suture was accomplished in SL group and in SFS group the suture was associated with the fibrin sealant (CEVAP). After 60 days the animals were euthanized, soleus muscles were removed and analyzed by confocal microscopy to obtain the morphology and morphometry of the nAChRs ( $\alpha$ -bungaratoxin) and the morphology of the nerve terminal (NF200) and by western blotting to obtain the quantification of nAChRs ( $\alpha 1$ ,  $\epsilon$  e  $\gamma$ ), S100, Agrin, MMP-3, MuSK and Rapsin. The qualitative assessment showed in SC group that nAChRs presented a normal morphology with continuous branches and preserved nerve terminals. In DC group it was observed flattening of the neuromuscular junction, fragmentation of nAChRs, with distribution in "islands" and tangled nerve terminals. In SL and SFS groups, the morphology was in-between groups SC and DC, with thinner nerve terminals. The morphometric data were compatible with the morphology and the majority of the parameters of SL and SFS groups presented values in-between the SC and DC groups. There was an increase of relative planar area in the reconstruction groups, highlighting that there was less nAChRs fragmentation. The values found in the protein expression in SL and SFS groups were similar to SC group and showed a return of the nAChRs mature pattern justified for the  $\epsilon$  subunit expression. Inverse values were found in  $\gamma$  subunit. Based on the similarity of observed results in reconstruction groups, it was possible to conclude that there was a return of both nAChRs morphology and associated proteins to the mature pattern. The fibrin sealant associated with reduced number of stitches was viable due to the smaller values of immature receptor ( $\gamma$ ) expression compared to the suture group.

## Sumário

|                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Lista de Figuras.....                                                                                                                                                                                                       | 11 |
| Lista de Abreviações .....                                                                                                                                                                                                  | 12 |
| 1.0 Introdução .....                                                                                                                                                                                                        | 13 |
| 1.1 Junção Neuromuscular (JNM).....                                                                                                                                                                                         | 13 |
| 1.1.1 Agrina.....                                                                                                                                                                                                           | 22 |
| 1.1.2 Receptor lipoprotéico relacionado a proteína 4 (Lrp4) .....                                                                                                                                                           | 23 |
| 1.1.3 Receptor tirosina quinase músculo-específico (MuSK).....                                                                                                                                                              | 24 |
| 1.1.4 Rapsina.....                                                                                                                                                                                                          | 25 |
| 1.1.5 Metaloproteinase de matriz - 3 (MMP-3).....                                                                                                                                                                           | 25 |
| 1.2 Lesões nervosas periféricas (LNPs) e Junção Neuromuscular (JNM) .....                                                                                                                                                   | 26 |
| 1.3 Reparação nervosa após lesões nervosas periféricas .....                                                                                                                                                                | 29 |
| 2.0 Objetivos .....                                                                                                                                                                                                         | 31 |
| 2.1 Objetivos Específicos .....                                                                                                                                                                                             | 31 |
| 3.0 Materiais e Métodos .....                                                                                                                                                                                               | 31 |
| 3.1 Animais de experimentação .....                                                                                                                                                                                         | 31 |
| 3.2 Protocolo cirúrgico .....                                                                                                                                                                                               | 31 |
| 3.3 Microscopia Confocal para nAChR e Terminal Nervoso .....                                                                                                                                                                | 33 |
| 3.4 Análise da expressão proteica por Western Blotting .....                                                                                                                                                                | 34 |
| 4.0 Análise estatística .....                                                                                                                                                                                               | 35 |
| Referências Bibliográficas.....                                                                                                                                                                                             | 36 |
| <br><b>Capítulo 1</b> - The association between fibrin sealant to a single stitch of suture promotes the return of morphology and neuromuscular junction structure to the mature pattern after nerve peripheral lesion..... | 45 |
| <br><b>Anexo 1</b> – Certificado CEUA .....                                                                                                                                                                                 | 71 |

## **Lista de figuras e Tabelas**

**Figura 1** – Desenvolvimento e consolidação das junções neuromusculares. (Página 14)

**Figura 2** – Morfologia da junção neuromuscular. Desde a origem do neurônio motor na medula espinal até a inervação na fibra muscular. (Página 15)

**Figura 3** – Junção neuromuscular adulta. (A) o compartimento pré-sináptico; (B) o compartimento extracelular ou fenda sináptica; (C) o compartimento pós-sináptico. (Página 16)

**Figura 4-** Detalhe da região pós-sináptica – dobras juncionais: Ápice (receptores de acetilcolina), Fundo (Canais de Sódio). Outras proteínas incluindo Agrina, MuSK, Rapsina que estão envolvidas no agrupamento dos receptores de acetilcolina estão presentes no sarcolema próximo aos receptores. (Página 18)

**Figura 5-** Maturação da junção neuromuscular. (Página 19)

**Figura 6-** Estrutura dos receptores de acetilcolina. (Página 19)

**Figura 7-** Ação coordenada de sinais positivos e negativos na junção neuromuscular. (Página 21)

**Figura 8-** Interação específica das proteínas Agrina/Lrp4/MusK/Rapsina com os receptores de acetilcolina no sarcolema da fibra muscular. (Página 22)

**Figura 9-** Fotografias das técnicas cirúrgicas utilizadas em todos os grupos experimentais. **A-** Incisão. **B-** Localização do Nervo Isquiático (seta). **C-** Neurotome. **D-** Visualização do coto proximal e distal após 7 dias. **E-** Detalhe da neurorrafia (seta-sutura). **E-** Detalhe da neurorrafia associada ao selante de fibrina (seta-coágulo formado pelo selante). (Página 33)

**Tabela 1.** Relação de anticorpos primários e secundários. (Página 35)

## LISTA DE ABREVIACÕES

ACh- Acetilcolina  
 AChE – Acetilcolinesterase  
 AChR – Receptores de acetilcolina  
 $\text{Ca}^{2+}$  - Cálcio  
 CD- Controle Desnervado  
 CEUA- Comissão de ética no uso de animais  
 CEVAP- Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos  
 CS- Controle Sham  
 CSs - Células de Schwann  
 DAPI –contra-coloração do meio de montagem (4', 6-diamidino-2-phenylindole)  
 DGC - Complexo glicoproteína-distrofina  
 Dok-7 – Proteína citoplasmática derivada da quinase 7  
 ErbB - receptores de tirosina quinase  
 FMB- Faculdade de Medicina de Botucatu  
 g – gramas  
 GAPDH- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
 JNM- Junção Neuromuscular  
 JNMs- Junções Neuromusculares  
 $\text{K}^{+}$  - potássio  
 Kg- quilogramas  
 LNP- Lesão Nervosa Periférica  
 LNPs- Lesões Nervosas Periféricas  
 Lrp4 - Receptor lipoprotéico relacionado a proteína 4  
 LS- Lesão + Sutura  
 LSS- Lesão Sutura + Selante de Fibrina  
 MEPPs - Potenciais de placa terminal em miniatura  
 mg- miligramas  
 $\text{mg}^{2+}$  - Magnésio  
 ml - mililitros  
 mm- milímetros  
 MMP-3 - Metaloproteinase de matriz - 3  
 MuSK- Receptor tirosina quinase músculo-específico  
 $\text{Na}^{+}$  - Sódio  
 nAChRs – Receptores nicotínicos de acetilcolina  
 NRG – neuregulina  
 rpm - Rotações por minuto  
 SNP - Sistema nervoso periférico  
 TBSt- Tris-buffered saline with Tween  
 UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
 UNIPEX- Unidade de Pesquisa Experimental- Faculdade de Medicina de Botucatu  
 $\mu\text{l}$ - microlitros  
 $\mu\text{m}$ - micrômetros  
 $\pi$  – Pi (valor de pi = 3,1416)

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 JUNÇÃO NEUROMUSCULAR (JNM)

O processo de inervação durante o desenvolvimento do músculo esquelético é um evento de alta relevância que implica em sofisticadas interações entre o axônio e as fibras musculares. Essa interação resulta em uma região especializada de contato entre o neurônio motor e as fibras musculares denominada de junção neuromuscular (JNM) (Hall e Sanes, 1993; Witzemann, 2006; Engel, 2008; Ferraro et al., 2012; Jones et al., 2017; Seene et al., 2017; Tu et al., 2017; Liu e Chakkalakal, 2018).

Trata-se de uma das primeiras sinapses formadas durante o desenvolvimento de mamíferos (Sanes e Lichtman, 1999; Hughes *et al.*, 2006; Malomouzh, 2012; Bloch-Gallego, 2015; Rogers e Nishimune, 2016; Seene *et al.*, 2017) e é através dela que ocorre a transmissão de um sinal elétrico (potencial de ação/impulsos nervosos) do neurônio motor para a fibra muscular esquelética promovendo a contração muscular (Vock *et al.*, 2008; Fagerlund e Eriksson, 2009; Tintignac, L. A. *et al.*, 2015).

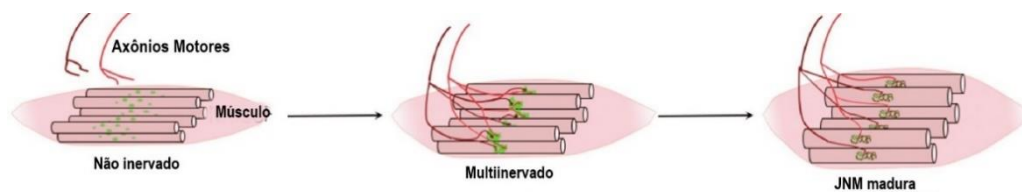
Doyere (1840) foi o primeiro a observar que as fibras nervosas terminavam em eminências características nas fibras musculares, a qual foi descrita pela primeira vez em microscopia de luz pelo fisiologista alemão Wilhelm Friedrich Kühne (1837–1900) (Liu e Chakkalakal, 2018).

Em 1947, Couteaux obteve a primeira coloração histológica de uma JNM madura (Tsuji, 2006), cujo estudo serviu de base para a caracterização ultraestrutural dessa sinapse (De Robertis e Bennett, 1955; Birks *et al.*, 1960), dos princípios funcionais da transmissão sináptica (Katz e Lou, 1947; Katz e Miledi, 1969; Katz, 1971) e para demonstrar que a regeneração axonal após lesão nervosa faz uso das vias nervosas originais para conduzir os terminais do axônio em direção a JNM antiga seguindo sinais extracelulares (Letinsky *et al.*, 1976; Sanes *et al.*, 1978).

As JNMs são compostas por diferentes tipos de células especializadas, entre elas os neurônios motores, as fibras musculares esqueléticas e células de Schwann (CSs) terminais (Hong e Etherington, 2001; Court *et al.*, 2008; Griffin e Thompson,

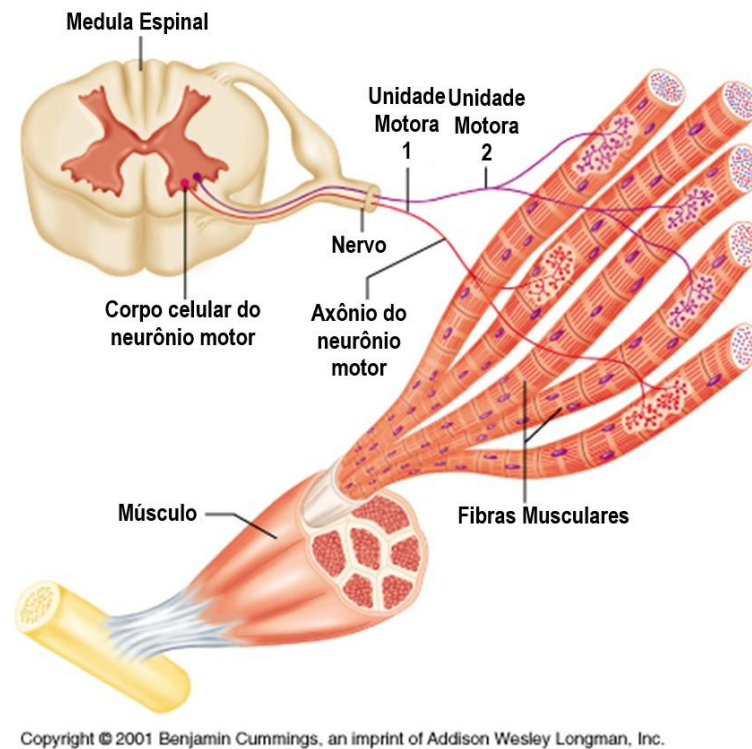
2008), caracterizando essa sinapse com uma morfologia própria (Fagerlund e Eriksson, 2009).

Antes do nascimento, as JNMs são morfologicamente e funcionalmente imaturas, sendo a sua maturação necessária para garantir uma neurotransmissão eficiente e induzir contrações musculares refinadas e precisas, para que isso ocorra é fundamental a sinalização entre as células pré e pós-sinápticas, ou seja, uma série de interações complexas entre os neurônios motores, as fibras musculares e as CSs dando origem a um terminal nervoso e uma membrana pós-sináptica altamente especializados (Darabid, Houssam *et al.*, 2014; Liu e Chakkalakal, 2018). Nesta fase de maturação, as fibras musculares são multiinervadas, já a JNM madura é innervada por um único axônio motor (Figura 1) (Liu e Chakkalakal, 2018).



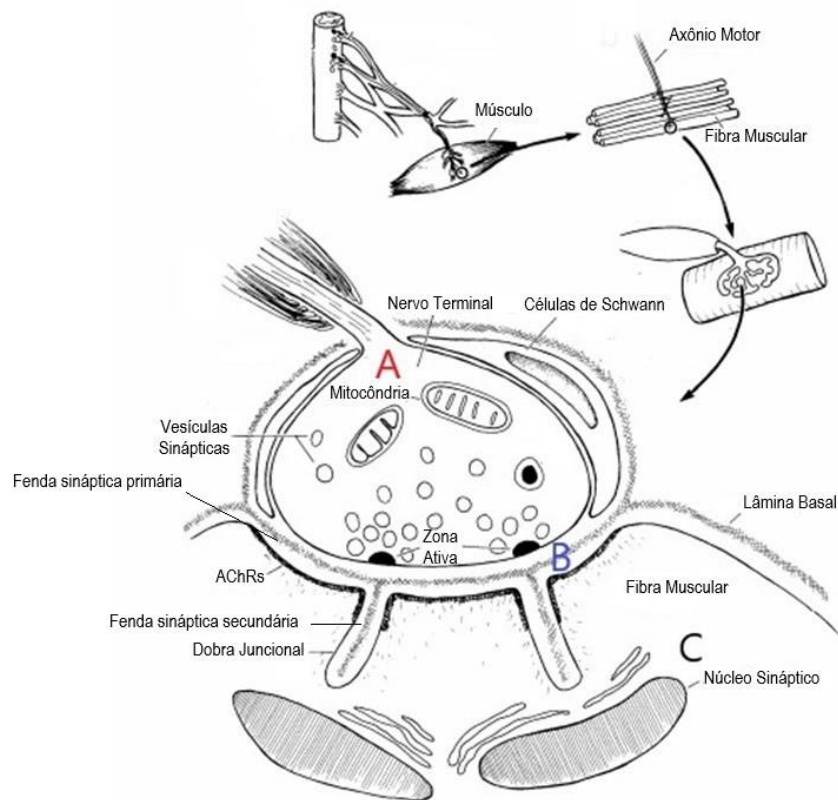
**Figura 1-** Desenvolvimento e consolidação das junções neuromusculares. Adaptado de Liu e Chakkalakal (2018).

Em adultos, o desenvolvimento e a maturação da JNM dependem da coordenação entre moléculas derivadas do nervo e do músculo, tendo como resultado final da sinaptogênese, a formação de um sítio de comunicação altamente eficiente, onde uma fibra muscular é innervada por um único axônio motor, porém os axônios de neurônios motores se ramificam intramuscularmente para innervar múltiplas fibras musculares. Sendo o conjunto do neurônio motor e todas as fibras musculares que ele innerva denominado de unidade motora, podendo o neurônio motor innervar uma única fibra ou então ramificar-se e innervar até 160 ou mais fibras (Larsson e Ansved, 1995; Sanes e Lichtman, 1999; Hepple e Rice, 2016) (Figura 2).



**Figura 2–** Morfologia da junção neuromuscular. Desde a origem do neurônio motor na medula espinal até a inervação na fibra muscular.

Morfologicamente, a JNM pode ser dividida em 3 compartimentos (Fagerlund e Eriksson, 2009): (1) o compartimento pré-sináptico; (2) o compartimento extracelular ou fenda sináptica primária; (3) o compartimento pós-sináptico (Figura 3).



**Figura 3** - Junção neuromuscular madura/adulta. (A) o compartimento pré-sináptico; (B) o compartimento extracelular ou fenda sináptica primária; (C) o compartimento pós-sináptico. Adaptado de Hall e Sanes (1993).

(1) Compartimento Pré-sináptico: é composto pelo terminal nervoso do axônio motor envolvido por células de Schwann (CSs) terminais, que são células gliais indispensáveis para a inervação normal do músculo (Tintignac, L. A. *et al.*, 2015).

O feixe de axônios motores envolvidos pela bainha de mielina, após penetrar no músculo pelo feixe neurovascular, divide-se em ramos intramusculares que percorrem o tecido conjuntivo entre as fibras musculares. Após abandonar o feixe nervoso intramuscular, os axônios motores passam a ser chamados de axônios pré terminais. Estes perdem sua camada de bainha de mielina próximo ao contato da fibra muscular e se ramificam em finas arborizações cujas terminações são levemente dilatadas, chamadas de botões terminais ou terminais nervosos, os quais se alojam em depressões na superfície da fibra muscular, denominadas de goteiras sinápticas (Hall e Sanes, 1993; Ruff, 2003; Fagerlund e Eriksson, 2009; Tintignac, Lionel A *et al.*, 2015)

O terminal nervoso é especializado e contém mitocôndrias, microtúbulos, neurofilamentos, retículo endoplasmático, lisossomos, partículas de glicogênio (Engel, 2008), ATP e uma alta concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (Whittaker, 1984) e é repleto de vesículas sinápticas contendo o principal neurotransmissor, a acetilcolina (ACh) (Deutch, 2014), agrupadas próximas a membrana pré-sináptica, formando placas densas chamadas de zona ativa, sendo que cada zona ativa encontra-se alinhada com o ápice das dobras juncionais (Hall e Sanes, 1993; Ruff, 2003). Neste local ocorre a fusão da vesícula com a membrana pré-sináptica liberando a ACh na fenda sináptica por exocitose, esse neurotransmissor irá se ligar aos nAChRs, subsequentemente propiciando a contração das fibras musculares (Hall e Sanes, 1993; Sanes e Lichtman, 1999; Hughes *et al.*, 2006; Fagerlund e Eriksson, 2009; Peng Chen *et al.*, 2012; Tintignac, L. A. *et al.*, 2015).

(2) Compartimento extracelular-fenda sináptica primária: constituída de uma estreita fenda que é limitada de um lado pelo terminal nervoso e de outro, pela fibra muscular, sendo ocupada pela lâmina basal sináptica que envolve a fibra muscular e as CSs terminais, estendendo-se entre as dobras juncionais do sarcolema pós-sináptico, na fenda sináptica secundária (Hall e Sanes, 1993). Muitas proteínas bioquimicamente especializadas e essenciais para o desenvolvimento e função da JNM estão aí presentes (Patton, 2003; Sanes, 2003), entre elas a laminina-4, laminina-9, laminina-11, colágeno IV, acetilcolinesterase (AChE) (Patton, 2003; Sanes, 2003; Engel, 2008).

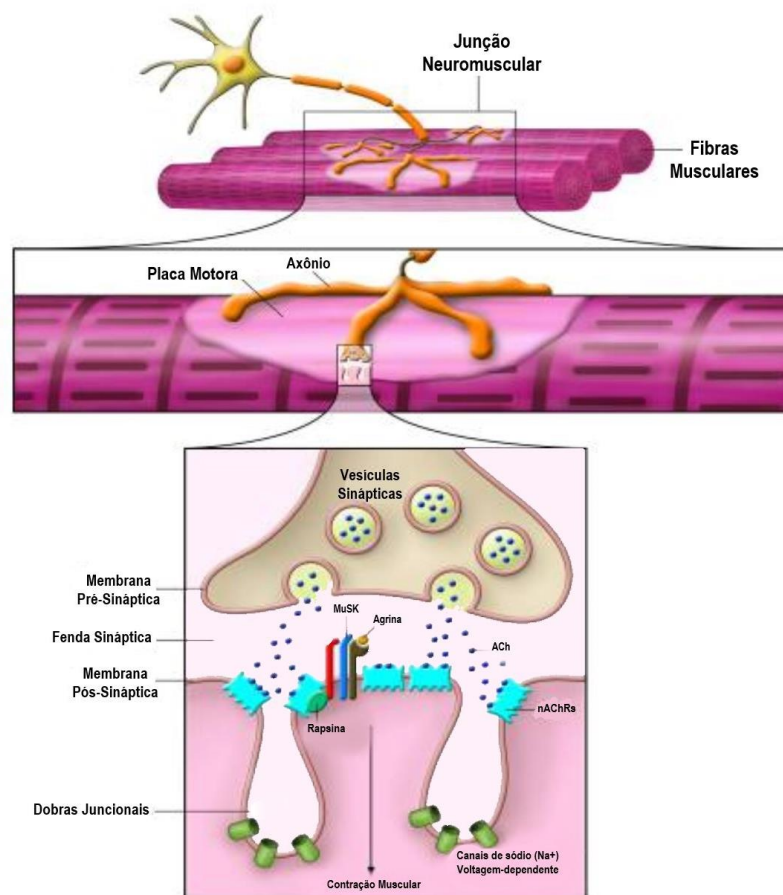
A AChE é uma das enzimas presente na fenda sináptica responsável por hidrolisar a ACh liberada do terminal nervoso motor em Acetilcoenzima A + Colina. A colina é reciclada dentro do próprio terminal nervoso devido à alta afinidade ao sistema de recaptação permitindo assim a re-síntese de ACh (Sanes, 2003; Fagerlund e Eriksson, 2009; Malomouzh, 2012; Slater, 2017).

(3) Compartimento pós-sináptico: compreende o sarcoplasma juncional, que é caracterizado pela presença de núcleos sub-sinápticos responsáveis pela transcrição do RNA mensageiro das subunidades dos nAChRs, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi, estruturas lisossomais, microtúbulos e grânulos de glicogênio (Hall e Sanes, 1993; Ruff, 2003; Engel, 2008) e o sarcolema, que contém as dobras juncionais que resultam da interação mecânica do terminal nervoso sobre o sarcolema, aumentando a superfície pós

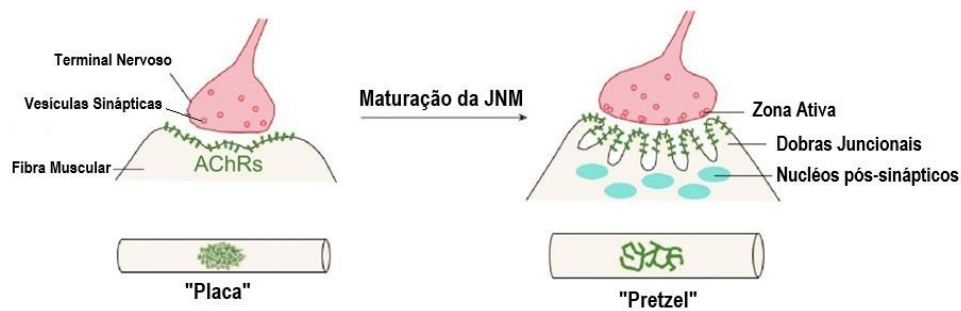
sináptica e portanto a eficácia da transmissão sináptica (Sanes e Lichtman, 1999; Marques *et al.*, 2000; Engel, 2008; Malomouzh, 2012).

As dobras juncionais (Sanes e Lichtman, 1999; Liu e Chakkalakal, 2018) possuem duas regiões distintas em forma e função: o ápice, onde os nAChRs estão agrupados juntamente com outras proteínas e o fundo, que contém diversas proteínas e os canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) voltagem-dependente responsáveis pela geração do potencial de ação (Sanes e Lichtman, 1999; Ruff, 2003) (Figura 4).

A medida que ocorre a maturação da JNM após o nascimento, a membrana pós-sináptica se invagina formando essas dobras, e os nAChRs concentram-se no ápice das dobras, e contribuem para mudança na forma da JNM, de placa plana para uma aparência característica semelhante a um “pretzel” (Figura 5) (Sanes e Lichtman, 2001).



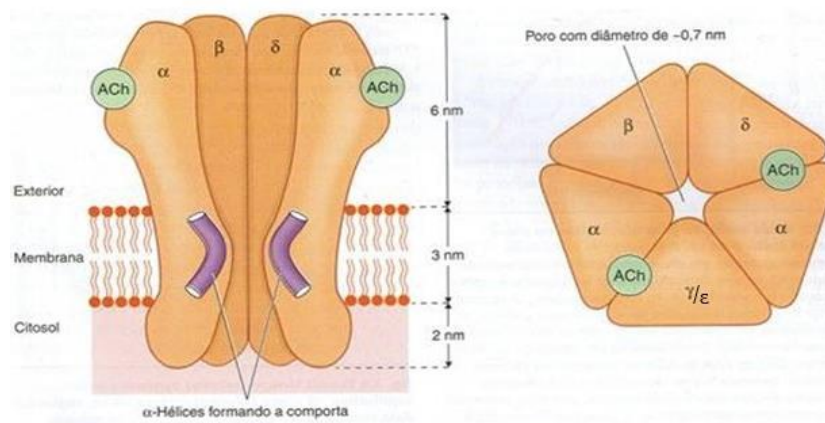
**Figura 4** - Detalhe da região pós-sináptica – dobras juncionais: Ápice (nAChR), Fundo (Canais de  $\text{Na}^+$ ). Outras proteínas incluindo Agrina, MuSK, Rapsina que estão envolvidas no agrupamento dos nAChR estão presentes no sarcolema próximo aos receptores. Adaptado de Conti-Fine *et al.* (2006).



**Figura 5-** Maturação da junção neuromuscular. Adaptado de Liu e Chakkalakal (2018).

Os nAChRs são compostos por cinco subunidades formando uma estrutura pentamérica, em forma de rosácea organizada ao redor de um poro central (canal iônico) (Changeux e Edelstein, 1998; Ma *et al.*, 2007). Esses canais são responsáveis pela recepção e transdução do sinal do terminal nervoso (Hall e Sanes, 1993).

Os nAChRs são distribuídos em duas formas: uma forma extrajuncional imatura, presente na fibra embrionária ou na fibra desnervada, constituída pelas subunidades  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$  (alfa, beta, delta e gama); e uma forma juncional madura, presente na JNM da fibra madura e innervada, consistindo das subunidades:  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  (alfa, beta, delta e epsilon) (Figura 6) (Mishina *et al.*, 1986; Schuetze e Role, 1987; Jin *et al.*, 2008).



**Figura 6** – Estrutura dos receptores de acetilcolina (Rang&Dale, Farmacologia - versão traduzida por Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G. 5ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004).

O sítio de ligação extracelular para a ACh ocorre na interface do domínio N-terminal das subunidades  $\alpha\delta$  e  $\alpha\epsilon$  (Pedersen e Cohen, 1990; Sine, 1997). A ligação simultânea de 2 moléculas de ACh inicia a mudança conformacional dos nAChR para a abertura do poro iônico (Grosman *et al.*, 2000). A duração do estado aberto depende da duração da ocupação de ACh neste local (Arias, 1998; Naguib *et al.*, 2002).

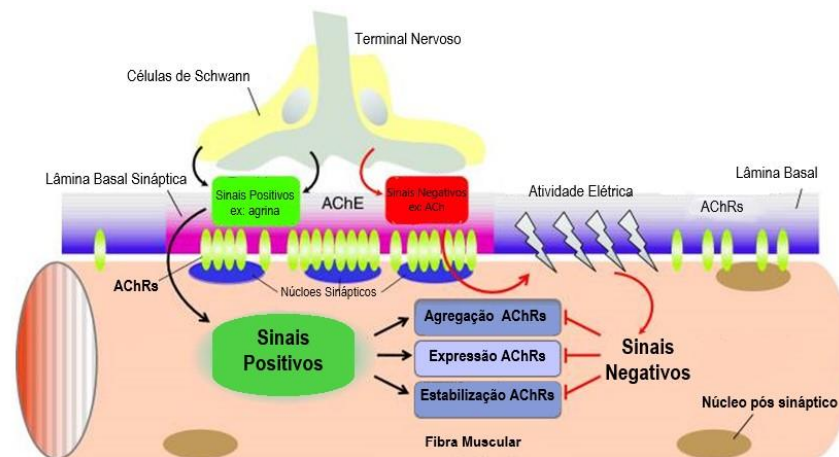
No processo de transmissão neuromuscular, ocorre a chegada do impulso nervoso na membrana pré-sináptica, a ativação e a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependente permitindo o influxo deste íon. Esse mecanismo permite a ativação de proteínas SNAREs (sinaptobrevina, SNAP-25 e syntaxina), comprometidas com a ancoragem e fusão das vesículas que contém o neurotransmissor ACh na membrana pré-sináptica (Peng Chen *et al.*, 2012). A ACh liberada na fenda sináptica liga-se às subunidades do receptor  $\alpha$  em suas interfaces com as subunidades dos receptores  $\delta$  e  $\gamma$  na fibra embrionária e  $\epsilon$  na fibra madura, iniciando uma mudança conformacional dos nAChRs, desencadeando pequenas despolarizações, havendo entrada de  $\text{Na}^+$  e saída de potássio ( $\text{K}^+$ ) concomitante a abertura de canais de  $\text{Na}^+$  voltagem-dependente presentes no fundo das dobras juncionais. Nesse local ocorre geração de potenciais de placa terminal excitatório em miniatura (MEPPs), sendo que quando um número suficiente de MEPPs é gerado dentro de um período curto de tempo, eles se somam para atingir o limiar de despolarização da fibra muscular, desencadeando a cascata de contração muscular (Unwin e Fujiyoshi, 2012; Unwin, 2013; Hurst e Gooch, 2016).

A agregação e manutenção das subunidades dos nAChR na região da placa motora requer ações coordenadas de moléculas derivadas do nervo e do músculo, caracterizadas como sinais positivos e negativos envolvidos na manutenção da estrutura da JNM (Figura 7) (Ferraro *et al.*, 2012; Darabid, H. *et al.*, 2014)

Dentre os **sinais positivos**, uma das vias de sinalização mais bem caracterizada é a via da Agrina /receptor lipoprotéico relacionado a proteína 4 (Lrp4)/receptor tirosina quinase músculo-específico (MuSK)/Rapsina cuja interação promove a concentração dos nAChRs na região sináptica.

A fim de que haja uma formação correta dos aglomerados de nAChR na membrana pós-sináptica, a presença dos sinais negativos diminuem a concentração de nAChR ao longo da fibra muscular, ou seja em áreas não sinápticas (Ferraro *et al.*, 2012).

Dentre os **sinais negativos**, o sinal elétrico desencadeado pelo terminal nervoso, que promove a despolarização do músculo e sua contração é o mais importante. Quando há contato do nervo com o músculo, há liberação de ACh pelo neurônio motor induzindo um potencial pós-sináptico que estabiliza previamente o agrupamento dos nAChR na área de contato e previne o agrupamento nas áreas sem contato com o neurônio motor (Ferraro *et al.*, 2012). A ACh liberada pelo potencial de ação induz a baixa regulação da transcrição dos nAChR ao longo da fibra muscular, iniciando o acúmulo de nAChR somente na área sináptica, o que resulta na supressão dependente de ACh na transcrição dos genes das subunidades dos nAChR dos núcleos extrasinápticos (Salpeter *et al.*, 1986; Ferraro *et al.*, 2012)



**Figura 7** – Ação coordenada de sinais positivos e negativos na junção neuromuscular. Adaptado de Wu *et al.* (2010).

Além dos sinais positivos e negativos descritos associados ao nervo e músculo, outras células como as células de Schwann (CSs) terminais que são essenciais para formação, maturação e manutenção da sinapse neuromuscular, contribuem para a concentração de nAChRs na membrana pós-sináptica (Liu e Chakkalakal, 2018) e atuam na regeneração da JNM (Nishimune e Shigemoto, 2018).

Essas células protegem o terminal nervoso de lesões químicas e mecânicas, tendo um importante papel na regeneração após dano ao terminal nervoso (Hall e Sanes, 1993; Sanes e Lichtman, 1999; Ullian *et al.*, 2001; Feng e Ko, 2008; Fagerlund e Eriksson, 2009; Sugiura e Lin, 2011).



rapsina, neuregulina (NRG), e receptores ErbB (Jones *et al.*, 1997; Herbst e Burden, 2000).

Em camundongos com deficiência de agrina, as placas terminais inicialmente formadas não são mantidas e a inervação é anormal, sendo que os embriões morrem logo ao nascer (Witzemann *et al.*, 2013). O principal papel da Agrina é iniciar a sinalização neuromuscular através da autofosforilação do MuSK (Kim *et al.*, 2008).

As duas proteínas, agrina e MuSK, não interagem diretamente sendo que proteínas co-receptoras estão presentes nessa sinalização (Wu *et al.*, 2010). Sendo que a autofosforilação do MuSK ocorre após a ligação da agrina ao Lrp4 (Kim *et al.*, 2008) (Figura 9).

### **1.1.2 Receptor lipoprotéico relacionado a proteína 4 (Lrp4)**

O Lrp4 é um receptor muscular funcional para agrina neuronal (Figura 9)(Kim *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Trata-se de uma proteína transmembrânica de passagem única, pertencente à família de receptores lipoprotéicos de baixa densidade (LDLR)(Johnson *et al.*, 2005; Simon-Chazottes *et al.*, 2006) e é associado ao MuSK (Kim *et al.*, 2008) podendo interagir com ele através de domínios extracelulares de duas proteínas MuSK (Kim *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008) e assim auxiliando na cascata de ativação proteica para o agrupamento dos nAChRs (Wang *et al.*, 2008). Juntamente com outras proteínas pós-sinápticas, torna-se concentrado e ancorado na membrana pós-sináptica (Burden *et al.*, 2018).

O Lrp4 pode interagir com o MuSK mesmo na ausência da agrina, mas a interação é potencializada quando a agrina está presente (Yan *et al.*, 2018), aumentando assim as vias de ancoragem das proteínas pós-sinápticas e a transcrição específica da sinapse (Burden *et al.*, 2018).

A agrina liberada pelos neurônios motores se liga ao Lrp4 expresso no músculo e ativa o MuSK (Weatherbee *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Quando a Agrina se liga ao complexo pré-formado, inicia-se uma reorganização do MuSK, promovendo transfosforilação e atividade de quinases (Wu *et al.*, 2010). Uma vez, fosforilado, o MuSK ativa vias de sinalização que levam à diferenciação sináptica ativando Dok-7, Tid1 e Hsp90 $\beta$  (Okada *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Inoue *et al.*, 2009; Bergamin *et al.*, 2010).

### 1.1.3 Receptor tirosina quinase músculo-específico (MuSK)

O MuSK é uma glicoproteína transmembrânica pós-sináptica permanecendo restrita à membrana pós-sináptica da JNM (Figura 9) (Ghazanfari *et al.*, 2011). O MuSK interage diretamente com várias moléculas, com uma sequência normal de ativação: após agrina ser liberada do terminal nervoso se liga à Lrp4 e ativa o MuSK via autofosforilação, que é ativada e estabilizada por DOK-7, desencadeando uma série de etapas adicionais de sinalização intracelular, levando à fosforilação da tirosina da subunidade  $\beta$  dos AChR. A fosforilação dos AChRs recruta a proteína citoplasmática rapsina, que também concentra e ancora os AChR na membrana pós-sináptica (Evoli e Lindstrom, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Morren e Li, 2018).

O MuSK está ainda envolvido em outros aspectos do desenvolvimento da JNM (Tintignac, Lionel A *et al.*, 2015), estando co-localizado com os nAChRs (Valenzuela *et al.*, 1995), sendo que pode ser ativado de muitas maneiras independente da agrina (Mittaud *et al.*, 2004).

O MuSK inicia o controle dos nAChRs nas dobras juncionais e a sua redistribuição através da reorganização do citoesqueleto por meio da actina; atua na estabilização dos nAChR através da fosforilação, sendo que suas propriedades endocíticas e a manutenção do *turnover* são também importantes para o agrupamento dos nAChRs; ele atua ainda sobre sequências específicas de nucleotídeos de DNA (*enhancers*) alterando a transcrição dos genes dos nAChRs seletivamente nos núcleos sub-sinápticos (Wu *et al.*, 2010).

Vários estudos demonstraram que o MuSK desempenha um papel fundamental em todos os aspectos da diferenciação pós-sináptica, incluindo o pré-padrão dos nAChRs e a subsequente estabilização de AChRs nos locais sinápticos (Yang *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001).

Na ausência do MusK não há formação de JNMs, e mesmo os pré-padrões antes da inervação estão ausentes (Lin *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Kim e Burden, 2008).

A ativação do MuSK recruta Dok-7 e resulta no agrupamento e estabilização de proteínas pós-sinápticas essenciais, incluindo nAChRs e a proteína rapsina associada aos nAChRs (Witzemann *et al.*, 2013).

#### 1.1.4 Rapsina

A rapsina, conhecida como proteína 43K, é uma proteína de membrana associada ao lado citoplasmático da membrana plasmática, atuando como co-efetor no agrupamento dos nAChRs (Figura 9), com os quais está co-localizada no ápice das dobras juncionais (Flucher e Daniels, 1989).

A rapsina ancora os nAChRs na membrana do músculo nos estágios mais iniciais da sinaptogênese, incluindo o pré-padrão (Burden *et al.*, 1983) e pode se ligar a cada uma das quatro subunidades de nAChRs (Borges *et al.*, 2008; Burden *et al.*, 2018). Já o ancoramento dos nAChRs no citoesqueleto se dá através de interação específica com  $\alpha$ -actinina e microtúbulos (Zhang *et al.*, 2007).

A rapsina interage com o complexo distrofina-glicoproteína (CDG) que faz a conexão entre o citoesqueleto subsarcolemal (sintrofina, utrofina e distrobrevina) e proteínas da lâmina basal (lamininas) em associação com outros componentes de sinalização da JNM (Rafael e Brown, 2000; Pilgram *et al.*, 2010).

A estabilidade da rapsina é aumentada na sinapse pela chaperona Hsp90 $\beta$  (Takamori, 2017) e desse modo impede a dispersão dos nAChRs no sarcolema da fibra (Wu *et al.*, 2010).

A ativação de MuSK leva ao agrupamento de nAChRs através de rapsina, formando aglomerados onde os receptores estão presentes em alta concentração. Esse agrupamento é necessário para uma neurotransmissão eficiente e, portanto, para o funcionamento muscular normal (Zuber e Unwin, 2013; Liu e Chakkalakal, 2018).

A rapsina atua exclusivamente na via de ancoragem pós-translacional e não na via de transcrição específica da sinapse, ao contrário de agrina, Lrp4, MuSK e Dok-7 (Burden *et al.*, 2018).

Em camundongos *knockout* para rapsina, há falhas no agrupamento dos nAChRs (Gautam *et al.*, 1995), esses animais apresentam fraqueza muscular e morrem após o nascimento (Gautam *et al.*, 1995; Apel *et al.*, 1997).

#### 1.1.5 Metaloproteinase de matriz - 3 (MMP-3)

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas que estão envolvidas na regulação do espaço pericelular, com múltiplos papéis na remodelação tecidual e degradação de várias proteínas na matriz extracelular (Cui *et al.*, 2017).

Em particular, as MMP-3 estão associadas à regulação da estrutura sináptica, sendo sua atividade necessária para manter a estabilidade da JNM (Werle, 2008).

As MMP-3 são secretadas pelas CSs, sendo as principais enzimas responsáveis por controlar/clivar uma variedade de proteínas de matriz, incluindo colágeno, lamininas e proteoglicanas (Campanari *et al.*, 2016) como a agrina, resultando na perda da atividade agregadora dos nAChRs (Vansaun e Werle, 2000; Vansaun *et al.*, 2003; Werle e Vansaun, 2003; Werle, 2008). Assim sua ação altera a matriz extracelular que rodeia as sinapses, demonstrando que há uma ligação dinâmica entre a atividade sináptica e a estrutura molecular da matriz extracelular que a rodeia (Vansaun *et al.*, 2007).

JNMs de camundongos *knockout* para MMP-3 apresentam alterações que incluem aumento na coloração dos nAChRs e no número das dobras juncionais e ainda aumento nos níveis de Agrina e dos nAChRs (Luckman *et al.*, 2011).

De acordo com Werle (2008), a matriz é muito estável, mas é importante que seja remodelada. Distúrbios músculo esqueléticos levam a uma alteração na expressão e atividade das MMP-3 (Cui *et al.*, 2017).

No sistema neuromuscular, há vários exemplos de porque a remodelação da matriz é importante, como por exemplo, a alteração nas células musculares após mudanças nos padrões de atividade muscular (Werle, 2008) e na desnervação (Bezakova *et al.*, 2001; Chao *et al.*, 2013).

## **1.2 Lesões nervosas periféricas e Junção Neuromuscular**

Os nervos periféricos, assim como os demais tecidos, estão suscetíveis a doenças inflamatórias, metabólicas, tóxicas, genéticas, neoplásicas (De Girolami e Anthony, 2000) e lesões traumáticas, como compressão e esmagamento (Rigoni e Montecucco, 2017).

As JNMs também são afetadas por estas e outras condições, dentre elas as lesões nervosas periféricas (LNPs), as quais resultam em uma perda da conexão entre o axônio e o músculo, levando a uma degeneração dessas estruturas (Ruven *et al.*, 2017).

Os fatores etiológicos traumáticos comuns de LNPs, envolvem acidentes com veículos automotores, traumas por arma de fogo e arma branca, trações, estiramento, pinçamento, compressão e esmagamento (Campbell, 2008), além de

processos patológicos (Belkas *et al.*, 2004) e procedimentos cirúrgicos (Hundeshagen *et al.*, 2013).

Seddon (1942), introduziu uma classificação para as LNPs, onde a neuropraxia é caracterizada pela interrupção da condução nervosa por uma lesão na bainha de mielina, sem descontinuidade axonal, apresentando recuperação rápida e completa. Na axonotmese ocorre um bloqueio da condução nervosa decorrente de uma perda parcial na continuidade do axônio, sendo seguida do processo de degeneração Walleriana distal à lesão, a recuperação funcional nestes casos depende do crescimento axonal, e ocorre mais comumente associada a lesões por esmagamento e fraturas ósseas, sendo que a recuperação total é menos provável do que na neuropraxia. Já a neurotmese ocorre quando há transecção completa do nervo, havendo bloqueio da condução elétrica sendo então, considerada a forma mais grave de lesão nervosa. Este tipo de lesão não apresenta recuperação funcional espontânea, tornando-se necessária intervenção cirúrgica.

Quando um nervo é segmentado ocorrem mudanças no corpo celular proximal e distal ao segmento da lesão (Sarikcioglu, L. *et al.*, 2007; Grinsell e Keating, 2014), atrofia muscular é um dos sintomas mais comuns após uma LNP, estando a mesma associada a uma redução da atividade muscular esquelética (Tsai *et al.*, 2016).

A desnervação acarreta uma profunda atrofia na estrutura da placa terminal (Chao *et al.*, 2013) que torna o órgão alvo inviável para o nervo em regeneração, mesmo quando o nervo em regeneração é capaz de atingir seu alvo (Palispis e Gupta, 2017). Essa atrofia é acompanhada da desagregação dos nAChRs (Hartzell e Fambrough, 1972; Frank *et al.*, 1975; Steinbach, 1981; Palispis e Gupta, 2017), havendo redistribuição dos nAChRs através da fibra muscular (Hartzell e Fambrough, 1972; Frank *et al.*, 1975; Steinbach, 1981; Kurimoto *et al.*, 2015), com alterações do seu padrão para “ilhas”, com típicas áreas arredondadas contendo fragmentação (Rich, M. M. e Lichtman, J. W., 1989; Kawabuchi *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2017). Já os terminais nervosos apresentam perda de integridade e presença de ramificações irregulares (Mozaffar *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2014; Corrick *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2018).

Durante a desnervação, o AChR- $\epsilon$  é substituído pelo AChR- $\gamma$ , o que corresponde à forma muscular imatura (Yamane *et al.*, 2001), e resulta em transmissão neuromuscular desordenada, degradação de proteína muscular e,

atrofia muscular (Adams *et al.*, 1995; Carlson *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2007; Apel *et al.*, 2009; Cisterna *et al.*, 2014).

Em relação às proteínas de ancoragem dos nAChRs, a expressão de agrina é regulada negativamente (Cisterna *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2017). Já a introdução de agrina em músculos desnervados leva a formação do aparato pós-sináptico (Bezakova *et al.*, 2001).

Após desnervação há ainda alterações na ligação dinâmica entre a atividade sináptica e a estrutura molecular da matriz extracelular que rodeia a JNM (Vansaun *et al.*, 2007). Sendo que após desnervação a deleção genética da MMP3, leva a estabilização das JNMs (Chao *et al.*, 2013).

Na desnervação as MMP-3 promovem a remoção da mielina danificada, através da presença de macrófagos que atuam fagocitando os fragmentos danificados de células e fibras musculares (Sarikcioglu, Levent *et al.*, 2007). Já a introdução de Agrina em músculos desnervados leva a formação do aparato pós-sináptico (Bezakova *et al.*, 2001).

Segundo Gribble *et al.* (2018), o Lrp4 promove a regeneração através de um mecanismo extrínseco do axônio independente da ancoragem à membrana e da sinalização do co-receptor MuSK o qual é essencial para desenvolvimento sináptico. O Lrp4 promove a regeneração nervosa periférica através do realinhamento das CSs desnervadas com os axônios em regeneração.

Neste contexto, as CSs pré-sinápticas na desnervação podem assumir um papel fagocítico e remover o material celular danificado, limpar a área pré-sináptica e preparar a regeneração, a fim de promover uma ligação renovada do neurônio motor à membrana muscular pós-sináptica, guiando os axônios motores em regeneração para as placas terminais desnervadas através de uma extensão de processos que começam alguns dias após a lesão do nervo (Koirala *et al.*, 2003; Tintignac, Lionel A *et al.*, 2015; Sakuma *et al.*, 2016).

A recuperação funcional após lesão nervosa é bastante limitada (Bentolila *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003; Ray e Mackinnon, 2010; Kang *et al.*, 2011; Gordon e Borschel, 2017). Os principais fatores limitantes desta recuperação são: conexões inadequadas entre os axônios e o órgão-alvo, aderências teciduais, além de atrofia e contraturas musculares decorrentes de longos períodos de imobilização (Alluin *et al.*, 2009; Tung e Mackinnon, 2010), bem como perda das placas terminais nas JNM (Sullivan *et al.*, 2016).

### 1.3 Reparação nervosa após lesão nervosa periférica

Nos últimos dez anos várias estratégias vêm sendo utilizadas a fim de promover à continuidade entre os cotos nervosos visando restabelecer a funcionalidade da área de injúria (Martins, R. S., Siqueira, M. G., Da Silva, C. F., *et al.*, 2005; Martins, R. S., Siqueira, M. G., Silva, C. F., *et al.*, 2005; Ray e Mackinnon, 2010). Do ponto de vista funcional, ainda não é possível promover uma regeneração nervosa totalmente eficiente, tratando-se assim de um desafio para a medicina (Paprottka *et al.*, 2013).

Dentre as técnicas para correção das LNPs, a neurorrafia término-terminal (NTT) é a mais clássica (Hosseinian *et al.*, 2015; Takhtfooladi e Sharifi, 2015), sendo a mesma realizada quando os cotos proximal e distal apresentam-se visíveis e íntegros, sem perda de tecido, possibilitando a conexão dos mesmos (Rovak *et al.*, 2001).

Como alternativa a convencional sutura e ou mesmo coadjuvante, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos para solucionar ou minimizar os problemas decorrentes a essa técnica, e uma das alternativas tem sido o uso de cola biológica (Moy *et al.*, 1988; Elgazzar *et al.*, 2007; Sandrini *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Entretanto, faltam estudos que ampliem o conhecimento definitivo em relação às mesmas (Martins, R. S., Siqueira, M. G., Da Silva, C. F., *et al.*, 2005).

Young e Medawar (1940) foram os pioneiros a utilizar o coágulo de fibrina para promover aderências, com o objetivo de selar tecidos e feridas sem produzir qualquer tipo de trauma. Essa substância adesiva surgiu com o intuito de acelerar a prática cirúrgica e facilitar a manutenção adequada da orientação original do nervo (Narakas, 1988; Rafijah *et al.*, 2013).

Um estudo comparando o uso apenas de selante de fibrina, sutura e a combinação das duas técnicas após a lesão do nervo isquiático mostrou que o selante de fibrina apresentou melhores resultados que a sutura (Martins, Roberto Sergio *et al.*, 2005) e Segundo Félix *et al.* (2013) o selante promove aumento na área da bainha de mielina e das fibras nervosas lesionadas.

Um grupo de pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos - CEVAP, desenvolveram o selante de fibrina derivado de veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* (cascavel), onde a trombina bovina é substituída por uma proteína derivada do veneno desta serpente. Esta proteína é capaz de transformar o fibrinogênio diretamente em fibrina, formando assim um coágulo

estável (Thomazini-Santos *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2011; Gasparotto *et al.*, 2014). Em sua composição o crioprecipitado contendo fibrinogênio e fatores de coagulação são derivados do sangue de búfalo, e a trombina responsável é substituída pela gíroxina, uma proteína trombina-like capaz de clivar fibrinogênio em monômeros de fibrina (Ferreira, 2014). A utilização deste selante de fibrina no reparo de LNPs vem apresentando resultados bastante promissores (Buchaim *et al.*, 2015).

Estas substâncias transcrevem os passos fisiológicos finais na cascata da coagulação que conduzem à formação do coágulo. Este selante de fibrina é também mais barato do que colas de fibrinas comerciais, fácil de aplicar e é possível sua utilização em modelos animais (Barbizan *et al.*, 2013). Além disso, tem uma boa capacidade adesiva, podendo ser utilizado junto a procedimentos de sutura tradicional (Barros *et al.*, 2009).

Neste sentido, o uso deste selante pode ser considerado como uma alternativa para o tratamento de LNP (Barbizan *et al.*, 2013) e está sendo utilizado em vários modelos experimentais de cirurgia para recuperação de lesão nervosa (Reis, 2000), tendo um papel importante no processo de regeneração celular e tecidual (De Oliveira Rosso *et al.*, 2017).

Embora haja regeneração axonal, em músculos distais com JNMs apresentando estrutura aparentemente normal, a falha na ativação elétrica muscular persiste (Sakuma *et al.*, 2016).

Desse modo a complexidade do aparato da JNM e das proteínas responsáveis por sua maturação, estabilidade e função indicam que a conexão entre os neurônios e as fibras musculares é crucial. A agregação e estabilidade dos nAChRs na área onde os terminais do axônio justapõem-sena membrana pós-sináptica é responsável pela capacidade da JNM de gerar o potencial de ação que promove a contração muscular e contribui para manter sua função. Sendo que falhas na reinervação da JNM, acompanhada de alterações nas suas proteínas estruturais, ocasionam defeito na capacidade de ativação elétrica muscular.

O reparo das LNPs através da neurografia é um método amplamente utilizado, porém a recuperação tanto morfológica quanto funcional é incompleta, sendo um desafio para a clínica médica. Diante disso métodos coadjuvantes como uso de selante de fibrina vêm sendo utilizados para minimizar danos e acelerar a recuperação nervosa e muscular, havendo poucas referências em relação às JNMs.

## 2.0 Objetivos

Diante do exposto o objetivo deste estudo foi verificar se o uso do selante de fibrina do CEVAP associado a um único ponto de sutura atinge ou supera os resultados da sutura convencional após LNP.

### 2.1 Objetivos específicos

- Análise morfológica dos nAChRs e dos terminais nervosos e morfométrica dos nAChRs através da microscopia confocal de varredura a laser
- Quantificação proteica: S100 (células de Schwann), Agrina, MuSK, MMP-3 e rapsina e das subunidades dos nAChRs:  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\epsilon$ .

## 3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados 40 ratos Wistar adultos machos, provenientes do Biotério Central da UNESP de Botucatu, com 90 dias de idade e peso corporal médio entre 300 – 400g. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixa de polietileno (medindo 40x30x15cm), com fundos sólidos, forrados com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro), temperatura (20 a 25 °C), sendo fornecida água filtrada e ração (Provence®) *ad libitum* (CEUA: 1173/2016). Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais: 1-Controle Sham (CS); 2- Controle Desnervado (CD); 3- Lesão + Sutura (LS); 4- Lesão Sutura + Selante de Fibrina (LSS).

### 3.2 Protocolo cirúrgico

Os ratos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina (Dopalen – 90mg/kg) e Xilazina (Rompun – 10mg/kg). Após tricotomia do membro inferior direito, os animais foram posicionados em decúbito ventral, mantendo-se os membros torácicos e pélvicos em abdução. Foi realizada a antisepsia com álcool-iodado, seguida de incisão sobre a face lateral da coxa, desde a altura do trocânter maior até o joelho e os nervos isquiáticos direitos foram expostos (Figura 9 A e B).

No grupo CS foi realizado apenas localização do nervo isquiático. Nos grupos desnervado (CD), Sutura (LS) e Sutura + Selante de Fibrina (LSS), de forma

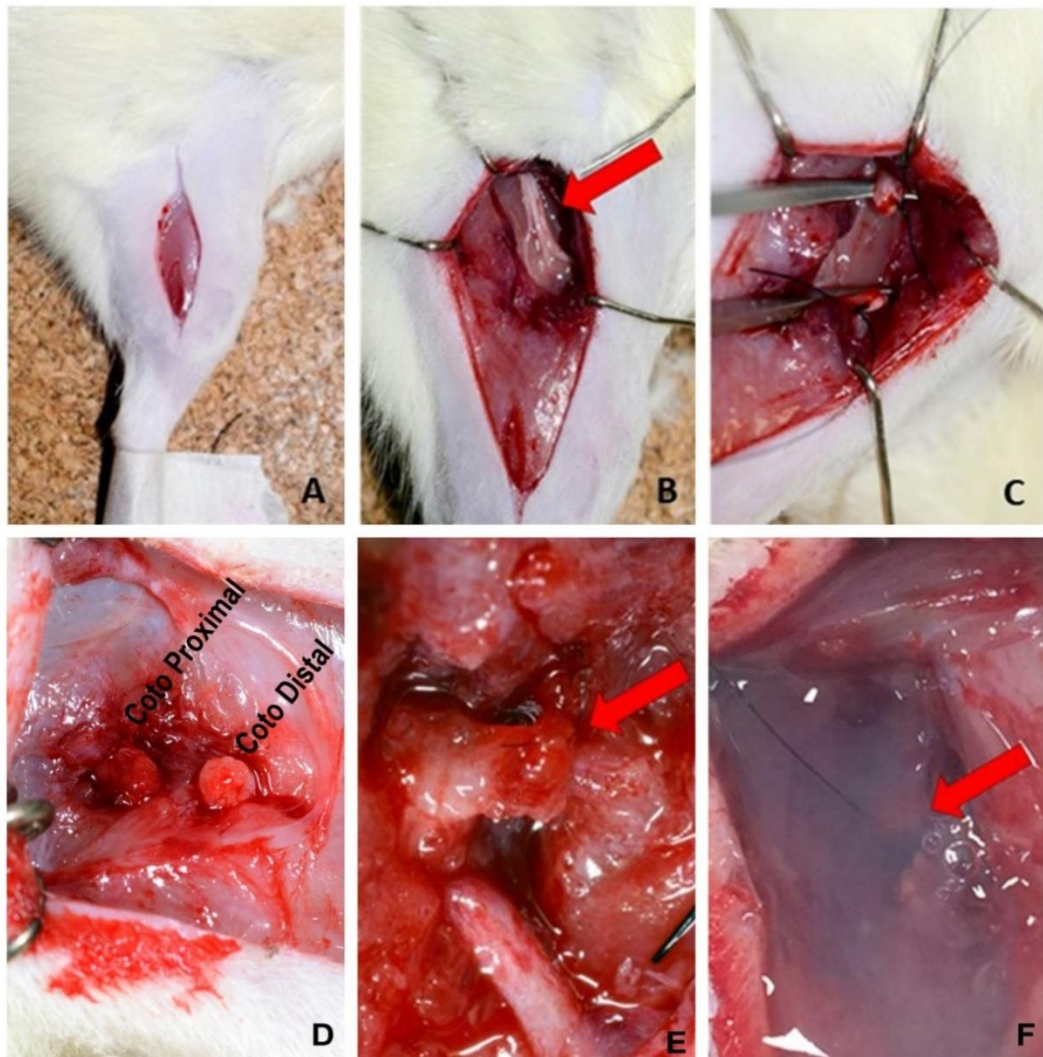
padronizada, a cerca de 3 mm distal a sua emergência, foi realizada uma lesão nervosa por transecção completa do nervo (Figura 9 C). Nos animais do grupo CD a fim de evitar regeneração espontânea, foi removido um fragmento de 6 mm do nervo isquiático. Após neurotmeze os cotos proximais e distais foram invertidos em 180 graus e fixados a musculatura adjacente, com pontos simples (Mononylon 5-0, Polysuture).

Decorridos 7 dias da neurotmeze, com um quadro de degeneração já estabelecido, os animais dos grupos LS e LSS passaram por microcirurgia reconstrutiva para reparo do nervo isquiático. Após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral, foi efetuada nova incisão, e os cotos antes fixados a musculatura adjacente foram submetidos à neurorrafia término-terminal (Figura 9 D).

No grupo LS, os cotos (Figura 9 D) foram suturados com três pontos simples (Mononylon 7-0, Polysuture). Já no grupo LSS a conexão entre os cotos proximais e distais (Figura 9E) se deu através de um único ponto de sutura associado a 100 µL de selante de fibrina, gentilmente cedido pelo CEVAP, Brasil, cujos componentes e fórmula de aplicação constam das suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360) (Figura 9 F). No momento do uso os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados sobre o local da lesão (Gasparotto, *et al.*, 2014).

Após a finalização de todos os procedimentos cirúrgicos, os tecidos moles foram suturados (Mononylon 5-0, Polysuture). Os animais ficaram sob aquecimento até a recuperação e ao acordarem foi administrado dipirona sódica via gavagem, por dois dias consecutivos, a cada 12 horas.

Após 60 dias todos os animais foram pesados e anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina (Dopalen – 90mg/kg) e Xilazina (Rompun – 10mg/kg), e em seguida eutanasiados conforme protocolo das análises realizadas.



**Figura 9-** Fotografias das técnicas cirúrgicas utilizadas em todos os grupos experimentais. **A-** Incisão. **B-** Localização do Nervo Isquiático (seta). **C-** Neurotome. **D-** Visualização do coto proximal e distal após 7 dias. **E-** Detalhe da neurotome (seta-sutura). **F-** Detalhe da neurotome associada ao selante de fibrina (seta-coágulo formado pelo selante).

### 3.3 Microscopia Confocal para nAChR e Terminal Nervoso (n=5/grupo)

Após anestesia e tricotomia da região peitoral, as vísceras torácicas foram expostas, e a perfusão foi realizada através do ventrículo esquerdo com bomba dosadora peristáltica Milan®, inicialmente com PBS e posteriormente fixação com paraformaldeído a 4%, ambos em um fluxo de 30ml/minuto. A aurícula direita foi seccionada junto ao átrio direito para escoamento do sangue e do excedente do líquido de perfusão.

Após perfusão o músculo sóleo direito foi removido, reduzido ao terço médio e a seguir seccionado longitudinalmente. Os fragmentos musculares foram mantidos em solução fixadora. Após 15 minutos os fragmentos musculares foram submetidos ao protocolo de imunofluorescência para marcação dos nAChRs com  $\alpha$ -bungarotoxina conjugada a rodamina (Rh-BTX – Molecular Probes T1175,1: 1000 em PBS) e dos terminais nervosos com anti-neurofilamento (Anti-neurofilament 200, Sigma N-5389, 1 $\mu$ l:1ml em solução bloqueadora) associado ao anti-mouse-IgG-FITC (Sigma® F-0257, 1 $\mu$ l: 1 ml em solução bloqueadora). A seguir os cortes foram montados em lâmina sob lamínula em meio de montagem para fluorescência VECTA SHIELD®(Vector Laboratories). As imagens foram obtidas utilizando um Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS modelo - SP5) pertencente ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências / UNESP, Botucatu.

Para a análise morfométrica foram utilizadas imagens de aproximadamente 50 JNM por animal por grupo experimental. Através do software Image J (versão 1.43u, National Institutes Health, USA) foram obtidos valores referentes à área da placa motora (área ao redor,  $\mu\text{m}^2$ ), área dos nAChR ( $\mu\text{m}^2$ ), área total da placa motora ( $\mu\text{m}^2$ ) e o maior eixo ortogonal dos nAChR ( $\mu\text{m}^2$ ). E a partir desses dados foram calculados: área relativa planar ( $\mu\text{m}^2$ , áreas dos nAChR/menor eixo ortogonal), diâmetro médio da JNM (raiz quadrada da área total da placa motora/ $\pi$ ) e densidade da placa motora (área dos nAChR/área ao redor do nAChR x 100%) (Sieck *et al.*, 2012).

### **3.4 Análise da expressão proteica por Western Blotting (n=5/grupo)**

Os animais foram anestesiados e após a eutanásia (tiopental sódico), os músculos sóleo foram removidos e as amostras do terço médio foram congeladas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em RIPA e inibidores de proteases (30mg de tecido / 100 $\mu$ l de tampão de extração).

As amostras foram obtidas após centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A quantificação total de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) e quantidades exatas da proteína total de cada amostra (30  $\mu$ g) foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) em um sistema umidificado.

As membranas foram incubadas *overnight* com anticorpos primários (Tabela 1), após esse período as membranas foram lavadas (solução basal: 10 mM Tris, 150 mM cloreto de sódio, 0,02% de Tween-20) e incubadas por 1 hora e 30 minutos em anticorpos secundários (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody- Cell Signaling – 7076 ou Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody- Cell Signaling – 7074).

As membranas foram lavadas novamente e foi utilizado reagente ECL™ Selected Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) para a captura da imagem em um transiluminador G-Box, a quantificação das bandas foi realizada usando o Image J 1.47, versão para Windows (National Institute of Health, Estados Unidos, EUA). Os valores de expressão proteica foram normalizados com os valores obtidos da proteína GAPDH, que foram utilizados como referência.

**Tabela 1.** Relação dos anticorpos primários

| Proteína            | Anticorpo Primário | Fabricante    | Código     |
|---------------------|--------------------|---------------|------------|
| GAPDH (14C10)       | GAPDH              | CellSignaling | #2118      |
| nAChR $\epsilon$    | Epsilon            | Santa Cruz    | sc - 13999 |
| nAChR $\gamma$      | Gama               | Santa Cruz    | sc13998    |
| nAChR $\alpha$ 1    | Alpha 1            | Santa Cruz    | sc-136130  |
| Rapsina             | Rapsyn             | Milipore      | #MAB2238   |
| S100                | Células de Schwann | Abcam         | ab4066     |
| Metaloproteinase- 3 | MMP-3              | Abcam         | ab52915    |
| MUSK                | MUSK               | Bioss         | Bs-6473R   |
| Agrina              | Agrina             | Abcam         | ab12362    |

#### 4.0 Análise estatística

Todos os dados foram analisados pelo Software Statistical Analysis System (SAS® v.9.3, Cary, North Carolina), para todos os dados foi utilizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os resultados da morfometria dos nAChRs, expressão proteica da agrina, MuSK, MMP-3 e nAChR  $\epsilon$  foram analisados pelo teste de One Way ANOVA seguido de pós teste de comparação múltipla de Tukey. O teste de Modelo linear generalizado com distribuição gama seguido de pós teste de comparação múltipla de Wald foi utilizado para as análises da expressão proteica de S100, AChR  $\alpha$ 1, AChR  $\gamma$ , rapsina. Resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão com nível de significância de  $p \leq 0.05$ .

















- YAN, M. et al. Agrin and LRP4 antibodies as new biomarkers of myasthenia gravis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1413, n. 1, p. 126-135, 2018. ISSN 1749-6632.
- YANG, X. et al. Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. **Neuron**, v. 30, n. 2, p. 399-410, 2001. ISSN 0896-6273.
- YANG, X. et al. DNA topoisomerase II $\beta$  and neural development. **Science**, v. 287, n. 5450, p. 131-134, 2000. ISSN 0036-8075.
- YOUNG, J.; MEDAWAR, P. Fibrin suture of peripheral nerves: measurement of the rate of regeneration. **The Lancet**, v. 236, n. 6101, p. 126-128, 1940. ISSN 0140-6736.
- YU, J. et al. Effect of electroacupuncture on the expression of agrin and acetylcholine receptor subtypes in rats with tibialis anterior muscular atrophy induced by sciatic nerve injection injury. **Acupuncture in Medicine**, p. acupmed-2015-011005, 2017. ISSN 0964-5284.
- YUAN, Q. et al. Induction of phosphorylated c-Jun in neonatal spinal motoneurons after axonal injury is coincident with both motoneuron death and regeneration. **Journal of anatomy**, v. 224, n. 5, p. 575-582, 2014. ISSN 0021-8782.
- ZHANG, B. et al.  $\beta$ -Catenin regulates acetylcholine receptor clustering in muscle cells through interaction with rapsyn. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 15, p. 3968-3973, 2007. ISSN 0270-6474.
- ZHANG, B. et al. LRP4 serves as a coreceptor of agrin. **Neuron**, v. 60, n. 2, p. 285-297, 2008. ISSN 0896-6273.
- ZHANG, W. et al. Agrin binds to the N-terminal region of Lrp4 protein and stimulates association between Lrp4 and the first immunoglobulin-like domain in muscle-specific kinase (MuSK). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 47, p. 40624-40630, 2011. ISSN 0021-9258.
- ZUBER, B.; UNWIN, N. Structure and superorganization of acetylcholine receptor–rapsyn complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 26, p. 10622-10627, 2013. ISSN 0027-8424.

## Capítulo 1

Artigo a ser submetido na revista: **Experimental Neurology** (Editor in Chief: Ahmet Hoke) Fator de impacto: 4.483

**The association between fibrin sealant to a single stitch of suture promotes the return of morphology and neuromuscular junction structure to the mature pattern after nerve peripheral lesion**

Carina Guidi Pinto<sup>1,2</sup>, Ana Paula SilveiraLeite<sup>1,2</sup>, Arthur Alves Sartori<sup>1</sup>, Felipe Cantore Tibúrcio<sup>1,2</sup>, Benedito Barraviera<sup>3</sup>, RuiSeabra Ferreira Junior<sup>3</sup>, Antônio de Castro Rodrigues<sup>4</sup>, André Luis Filadelpho<sup>1</sup>, Samara Camaçari de Carvalho<sup>5</sup>, Selma Maria Michelin Matheus<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Botucatu, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> São Paulo State University (UNESP), Medical School, Botucatu, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup> São Paulo State University (UNESP), The Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP), Botucatu, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>University Center of Adamantina - Unifai, Adamantina, São Paulo, Brasil

<sup>5</sup>University Center HermínioOmetto, FHO Uniararas, Araras, São Paulo, Brasil

**Grant:** FAPESP: 2017/06472-2

### Abstract

The neuromuscular junctions (NMJs) are affected by some conditions, among which the peripheral nerve lesions (PNLs). The denervation leads to a severe atrophy of the NMJ structure and the associated proteins. Alternative methods aimed at the return of neuromuscular morphology and its activity have been widely researched. The objective of this study was to verify if the fibrin sealant use associated with a single suture stitch have potential to reestablish the return of neuromuscular apparatus after ischiatic nerve lesion. Forty male adult Wistar rats were utilized (CEUA: 1173/2016), divided into 4 groups: Sham-Control (SC), Denervated-Control (DC), Suture Lesion (SL) and Suture Lesion + Fibrin Sealant (SFS). In the SC group only right ischiatic nerve identification was done. In DC (gap of 6 mm), SL and SFS groups fixation of stumps on the musculature after neurotmesis was performed. After 7 days the reconnection of the stumps with suture was realized in the SL group and in SFS group the suture was associated with the fibrin sealant (CEVAP). After sixty days the right soleus muscles were prepared for the morphology and morphometry of the nAChRs ( $\alpha$ -bungarotoxin), for the morphology of the nerve terminal (NF200) by confocal microscopy and nAChRs ( $\alpha$ 1,  $\epsilon$  e  $\gamma$ ), S100, Agrin, MMP-3, MuSK and Rapsin protein expression by western blotting analysis. The qualitative assessment showed in SC group that nAChRs presented a normal morphology with continuous branches and preserved nerve terminals. In DC group it was observed flattening of the neuromuscular junction, fragmentation of nAChRs, with distribution in "islands" and tangled nerve terminals. In SL and SFS groups, the morphology was in-between groups SC and DC, with thinner nerve terminals. The morphometric data were compatible with the morphology and the majority of the parameters of SL and SFS groups presented values in-between the SC and DC groups. There was an increase of relative planar area in the reconstruction groups, highlighting that there was less nAChRs fragmentation. The values found in the protein expression in SL and SFS groups were similar to SC group and showed a return of the nAChRs mature pattern justified for the  $\epsilon$  subunit expression. Inverse values were found in  $\gamma$  subunit. Based on the similarity of observed results in reconstruction groups, it was possible to conclude that there was a return of both nAChRs morphology and associated proteins to the mature pattern. The fibrin sealant associated with reduced number of stitches was viable due to the smaller values of immature receptor ( $\gamma$ ) expression compared to the suture group.

## INTRODUCTION

The neuromuscular junction (NMJ) is a peripheral, chemical, anatomical and highly-specialized synapse. It is formed during the prenatal development and transfers information efficiently from the motor nerve to the muscular fiber promoting quick muscular contraction (Fagerlund and Eriksson, 2009; Sanes and Lichtman, 1999; Sleight et al., 2014; Tintignac et al., 2015; Vock et al., 2008).

The formation, maturation, maintenance and stability of the NMJ are mediated by key molecular mechanisms (Wu et al., 2010), that contribute for the concentration and stability of the acetylcholine receptors (nAChRs) leading to effective muscular contraction (Darabid et al., 2014; Ferraro et al., 2012; Hurst and Gooch, 2016; Unwin, 2013; Unwin and Fujiyoshi, 2012). In addition, coordinated actions of molecules derived of the nerve and the muscle are present (Darabid et al., 2014; Ferraro et al., 2012) as the most well characterized signaling pathway which is the Agrin/ lipoproteic receptor related to protein 4 (Lrp4)/ muscle-specific tyrosine kinase receptor (MuSK)/ Rapsin.

The terminal Schwann cells (SCs) (Liu and Chakkalakal, 2018; Nishimune and Shigemoto, 2018) are involved in the regulation of the pericellular space with multiple roles in tissue remodeling and degradation of various proteins in the extracellular matrix (Cui et al., 2017), particularly metalloproteinases 3 (MMP-3) (Werle, 2008).

The NMJs are affected by some conditions, among which the peripheral nerve lesions (PNLs) that result in loss of connection between the axon and the muscle leading to a degeneration of these structures (Ruven et al., 2017), that usually require surgical intervention

The denervation leads to a severe atrophy of the NMJ structure (Chao et al., 2013), a disaggregation of nAChRs (Frank et al., 1975; Hartzell and Fambrough, 1972; Palispis and Gupta, 2017; Steinbach, 1981) and their anchoring proteins which are responsible for aggregating and maintaining the subunits of nAChRs in the region of the motor plaque (Darabid et al., 2014; Ferraro et al., 2012).

Searching for reinnervation and restitution of the nervous and muscular function, over the last years many strategies have been performed (Ray and Mackinnon, 2010). As an alternative to conventional suture, some studies have been developed to solve or minimize the problems resulting from this technique. Considering that the number of suture strands crossing the repair site can interfere on the repair results (Félix et al., 2013) and the foreign-body (suture) cause

inflammatory reaction (Chimutengwende-Gordon and Khan, 2012). Based on this, the option is the use of fibrin sealant and/or glue, that prevents fluid loss, promotes tissue adhesion, reduces the surgery time, the hemorrhage (Barros et al., 2009; Perussi Biscola et al., 2016) and the inflammation and fibrosis formation (Félix et al., 2013).

A group of researchers from the Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP) developed the fibrin sealant derived from the poison of the *Crotalus durissus terrificus* (rattle snake) snake and a protein derived from this snake venom replaces bovine thrombin. This protein is capable of transforming fibrinogen directly into fibrin making a stable coagulum (Barros et al., 2011; Barros et al., 2009; Gasparotto et al., 2014; Thomazini-Santos et al., 2001). Besides, fractions of buffalo blood are utilized to substitute human blood as a source of fibrinogen, avoiding thus the transmission of infectious diseases (Barbizan et al., 2013; Barbosa et al., 2008; Ferreira, 2014). These substances act as the final physiological steps in the coagulation cascade that lead to coagulum formation. This fibrin sealant is also cheaper than commercial glues, easy to apply and is viable for use in animal models (Barbizan et al., 2013).

In this sense, the use of these sealants may be considered a potential alternative for the treatment of PNLs (Barbizan et al., 2013) and it has been utilized in various experimental models of surgery for the recovery of nerve lesions (REIS, 2000).

The complexity of the NMJ apparatus and proteins that are responsible for its maturation, stability and function indicate that the connection between the neurons and muscular fibers is crucial. The aggregation and stability of nAChRs in the area where the axon terminals juxtapose with post-synaptic membrane is responsible for NMJ's ability of generating the action potential that promotes the muscular contraction and contributes to maintain its function. Failures in the reinnervation of NMJ, accompanied of alterations in its structural proteins, entail in problems of the electric muscular activation capacity.

This study was conducted after PNLs followed by neurorrhaphy of the ischiatic nerve and use of the fibrin sealant, with focus on the acetylcholine receptors and proteins associated in rat soleus muscles.

The objective of this study was to verify if the fibrin sealant use associated with a single stitch have potential to reestablish the return of neuromuscular apparatus after ischiatic nerve lesion.

## **Materials and Methods**

### **Experiment Animals**

Forty male adult Wistar rats were utilized (UNESP / Botucatu / SP / Brazil), with 90 days of age and mean body weight between 300-400g. These animals were kept during the experimental period in the UNIPLEX/FMB/Unesp under appropriate conditions (CEUA: 1173/2016). The animals in this study were divided into 4 experimental groups: Sham-Control (SC), Denervated-Control (DC), Suture Lesion (SL) and Suture Lesion + Fibrin Sealant (SFS).

### **Surgical Protocol**

The rats were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (Dopalen – 90mg/kg) and Xilazin (Rompun – 10mg/kg). After trichotomy of the right inferior limb, was realized incision of the lateral face of the thigh, from the height of the major trochanter to the knee and the ischiatic nerves were exposed.

In animals of the SC group was realized only localization of the ischiatic nerve. In the denervated (DC), suture (SL) and suture + fibrin sealant (SFS) groups, in a standardized manner, was realized a nerve injury by complete transection of the nerve at around 3 mm distally to its emergence. In animals of DC group, in order to avoid spontaneous regeneration, a 6 mm fragment of ischiatic nerve was removed. Upon neurotmesis, the proximal and distal stumps were inverted in 180° and fixated to the adjacent musculature, with simple suture stitches (Mononylon 5-0 nylon, Polysuture).

Seven days after neurotmesis, the animals of the SL and SFS groups underwent reconstructive microsurgery for the reparation of the ischiatic nerve. A new incision was realized and the nerve stumps were subjected submitted to end-terminal neurorrhaphy. In SL group, nerves stumps were linked with three simple suture stitches (Mononylon 7-0, Polysuture). In SFS group, the connection between the nerve stumps were made with a single suture stitch in addition to 100 µL of fibrin

sealant, gently ceded by CEVAP, Brazil, whose components and application formula are listed in its patents (Registri number: BR1020140114327 e BR1020140114360). In the moment of usage the components were previously unfrozen, reconstituted, mixed and applied over the local of lesion (Gasparotto et al., 2014).

After the surgical procedures, soft tissues were sutured (Mononylon 5-0, Polysuture). The animals were kept under warming until recovery and upon wakening, were given sodic dipyrone via gavage for two consecutive days every 12 hours.

Sixty days after all the animals were weighted, anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (Dopalen – 90mg/kg) and Xilazin (Rompun – 10mg/kg), and euthanized according to the protocol of the realized analysis.

### **Laser-scanning confocal microscopy analysis of the nAChR and Nerve Terminals (n=5/group)**

After anesthesia and trichotomy of pectoral region, the thoracic viscera were exposed, and perfusion was carried out via the left ventricle with peristaltic measuring pump Milan®, initially with PBS and posteriorly with fixation with paraformaldehyde 4%, both at a flux of 30ml/minute. The right auricle was sectioned together with the right atrium for the flowing of the blood and excess of the perfusion liquid.

After perfusion the right soleus muscle was removed, reduced to the medium third and sectioned longitudinally. The muscular fragments were submitted to immunofluorescence protocol for the nAChRs labelling with  $\alpha$ -bungarotoxin conjugated to rhodamine (Rh-BTX – Molecular Probes T1175, 1: 1000 in PBS) and the nerve terminals were labelled by anti-neurofilament (Anti-neurofilament 200, Sigma N-5389, 1 $\mu$ l:1ml in blocking solution) associated with anti-mouse-IgG-FITIC (Sigma® F-0257, 1 $\mu$ l: 1 ml in blocking solution). Following that, slices were mounted in slides under cover slips in VECTA SHIELD® mounting medium for fluorescence (Vector Laboratories). The images were acquired using a Laser Scanning Confocal Microscope (Leica TCS model - SP5) belonging to the Electron Microscopy Center of the Institute of Biosciences/UNESP, Botucatu.

For the morphometric analysis were utilized images of approximately 50 NMJ per animal per experimental group using the Image J software (version 1.43u,

National Institutes Health, USA). Measurements were taken of the motor endplate area (area around,  $\mu\text{m}^2$ ), nAChR area ( $\mu\text{m}^2$ ), total area of the motor endplate ( $\mu\text{m}^2$ ) and the largest orthogonal axis of the nAChR ( $\mu\text{m}^2$ ). And from these were calculated: relative planar area (area of nAChR/largest orthogonal axis of the nAChR,  $\mu\text{m}^2$ ), mean diameter of NMJ (square root of the total area of the NMJ/ $\pi$ ) and density of the motor endplate (area of nAChR/area around nAChR x 100%) (Sieck et al., 2012).

### **Western blotting (n=5/group)**

The animals were previously anesthetized and after euthanized (sodic thiopental), the soleus muscles were removed and samples from the middle third were frozen in liquid nitrogen, and homogenized in RIPA and inhibitors of proteases (30mg of tissue/100 $\mu\text{l}$  of extraction buffer). The samples were obtained after centrifugation during 20 minutes at 14000 rpm at 4°C and the supernatant was collected. Total protein quantification was determined by the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay) and exact quantities of the total protein of each sample (30  $\mu\text{g}$ ) were subjected to electrophoresis in polyacrylamide gels and then transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in a humidified system.

The membranes were incubated overnight with primary antibodies (Table 1). After this the membranes were washed (basal solution: Tris 10 mM, sodium chloride 150 mM, 0.02% of Tween-20) and incubated for 1 hour and 30 minutes in secondary antibody (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody- Cell Signaling – 7076 and Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody- Cell Signaling – 7074). The membranes were washed again, and reagent was used (ECL™ Selected Western Blotting Detection Reagent - GE Healthcare, Uppsala, Sweden) to image capture in a transilluminator G-Box, quantification of the bands was performed using Image J 1.47, version for Windows (National Institute of Health, United States Code, USA). The protein expression values were normalized with values obtained with the GAPDH protein, which was used as a reference.

**Table 1.** Relation of primary antibodies

| Protein             | Primary antibodies | Manufacturer  | Code       |
|---------------------|--------------------|---------------|------------|
| GAPDH (14C10)       | GAPDH              | CellSignaling | #2118      |
| nAChR $\epsilon$    | Epislon            | Santa Cruz    | sc - 13999 |
| nAChR $\gamma$      | Gamma              | Santa Cruz    | sc13998    |
| nAChR $\alpha$ 1    | Alpha 1            | Santa Cruz    | sc-136130  |
| Rapsina             | Rapsyn             | Milipore      | #MAB2238   |
| S100                | Schwann Cells      | Abcam         | ab4066     |
| Metaloproteinase- 3 | MMP-3              | Abcam         | ab52915    |
| MUSK                | MUSK               | Bioss         | Bs-6473R   |
| Agrin               | Agrin              | Abcam         | ab12362    |

### Statistical Analysis

The results were analyzed in Statistical Analysis Software System (SAS® v.9.3, Cary,North Carolina), normality test of Shapiro-Wilk was utilized for all data. Results of nAChRs morphometry, protein expression of agrin, MuSK, MMP-3 and nAChR  $\epsilon$  were analyzed by the One Way ANOVA test followed by post-test of multiple comparisons of Tukey. The linear model test generalized with gama distribution followed by Wald test of multiple comparisons was utilized for the analysis of protein expression of S100, AChR  $\alpha$ 1, AChR  $\gamma$ , and rapsyn. All the date were presented as mean  $\pm$  standard deviation with a significance level of  $p \leq 0.05$

## RESULTS

### Laser-scanning confocal microscopy analysis of the nAChRs and Nerve Terminals

In SC group (Figure 1 A-B) the nAChRs and the nerve terminals presented a distribution compatible with normality. Thus, the answers of the fluorophores were homogeneous, with nAChRs marked in autofluorescence and in continuous branches or “*pretzel*”, and with intact, preserved and without discontinuity nerve terminals. In DC group, a flattening and fragmentation of the nAChRs were observed and for the most part distributed in an “island” pattern (Figure 1 C-D). The nerve terminals were meshed with no clear visualization of the terminal axons, indicating an absence of preservation and integrity.

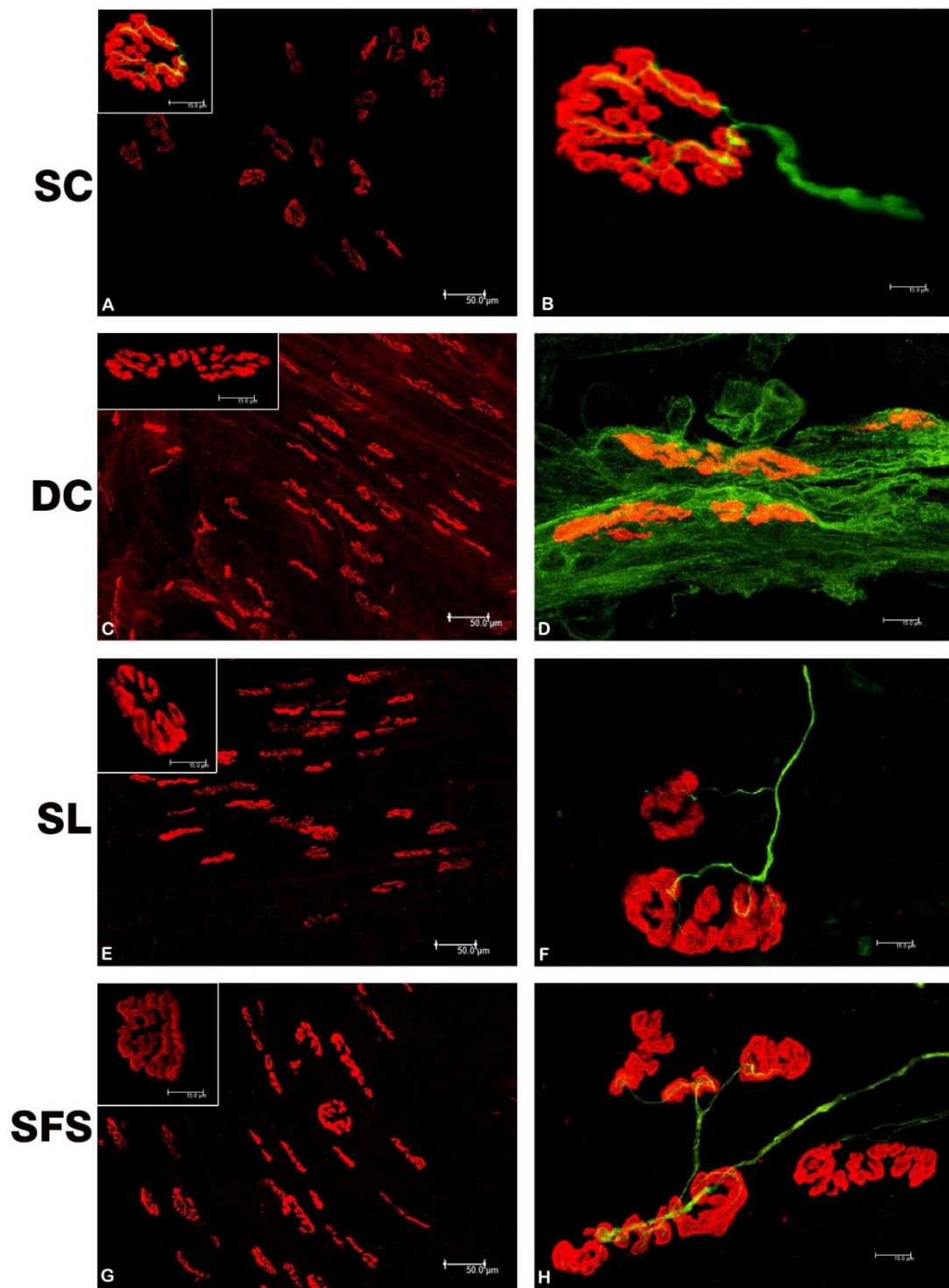
In SL and SFS groups the nAChRs distribution was closer to the pattern of continuous branches. Though the flattening was observed in some motor endplates, it was clear the observation of in-between morphology in the lesion groups compared to SC and DC groups. In relation to the nerve terminals, the ramifications were thinner when compared to SC groups (Figure 1 A-B, E-F, G-H).

The morphometric analysis was consistent with the morphological observations, where values referring to the area of the motor endplate, area of nAChRs, relative planar area, mean diameter of NMJ and density of the motor endplate were higher in the SC group (Table 2).

The values referring to the area of motor endplate (around) did not show a significant difference between the groups. However, the smaller values were present in DC group. The SL and SFS groups presented in-between values with SC and DC groups.

The DC group presented a significant reduction when compared to the control group in relation to all other parameters: 47% of the area of nAChRs and relative planar area, 26% in the mean diameter of NMJ and 15% on the density of the motor endplate.

The nerve reconstruction groups (SL and SFS), presented an increased relative planar area of 43% in SL and 34% in SFS group when compared to DC group. All other morphometric patterns analyzed presented in-between values with SC and DC groups, though not statistically significant (Table 2).

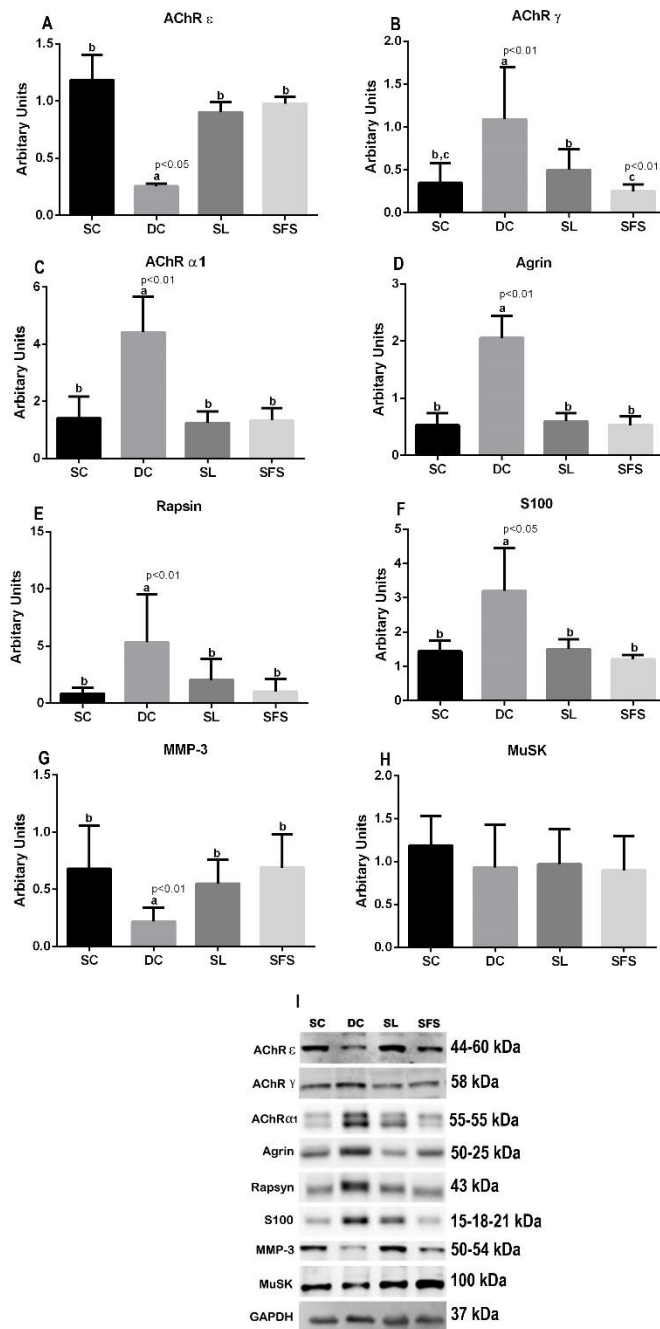


**Figure 1** – Confocal microscopy of the acetylcholine receptors (in red) and nerve terminals (in green). **A-B:** SC- Control Sham, **C-D:** DC- Control Denervated, **E-F:** SL- Suture Lesion e **G-H:** SFS- Suture Lesion + Fibrin Sealant.



compared to SC, presented values 2.8, 1.4 and 1.2 times superior of the protein expression of agrin, rapsyn and S100, respectively ( $p < 0.01$ ) (Figure 2 D-F).

The level of protein expression of MMP-3 was higher both in SL and SFS groups in relation to DC group, whose value was around 65% ( $p < 0.05$ ) lower in comparison to the experimental groups. On the reconstruction groups, values were similar to those of SC group (Figure 2 G). On MuSK analysis, no significant variations were noticed between the experimental groups (Figure 2 H).



**Figure 2.** Expression levels of AChR  $\epsilon$  (A), AChR  $\gamma$  (B), AChR  $\alpha 1$  (C), Agrin (D), Rapsyn (E), S100 (F), MMP-3 (G), MuSK (H) and representative immunoblots of these proteins (I). Agrin, MuSK, MMP-3 and nAChR  $\epsilon$  were analyzed by the One Way ANOVA test followed by post-test of multiple comparisons of Tukey. S100, AChR  $\alpha 1$ , AChR  $\gamma$ , and rapsyn were analyzed by the linear model test generalized with gamma distribution followed by Wald test of multiple comparisons. Equal letters for no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) and different letters for statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ )

## DISCUSSION

Our study was the first to evaluate denervation with focus on the NMJ and associated proteins utilizing CEVAP's fibrin sealant. Considering that, the preliminary results of our research group showed a significant improvement on the morphology of the denervated ischiatic nerve after reparation with the use of the fibrin sealant (data not published).

After PNL through neurotmesis there is need of surgical intervention (Grinsell and Keating, 2014) for a nervous regeneration which is slow (Buchaim et al., 2015; Grinsell and Keating, 2014) and it results in incomplete and unsatisfactory nerve and functional recovery (Biscola et al., 2017a; Cui et al., 2008). The searches for new surgical methods that contribute to minimize the number of sutures, to reduce the nerve tissue trauma are of great interest for researches in PNL.

These researches associated or not with the use of alternative techniques are essential to contribute for an improvement on the stability of coaptation of the nerve stump (Biscola et al., 2017a). Amongst the alternative methods and techniques, the use of fibrin sealants, which promote adhesion of tissues, can complement or even substitute the suture (Barros et al., 2009). The fibrin sealant presents as advantages the reduction of fluid loss, hemorrhage and inflammation and it reduces the surgical time (Barros et al., 2009; Biscola et al., 2017a; de Oliveira Rosso et al., 2017; Félix et al., 2013; Isaacs, 2010; Koulaxouzidis et al., 2015).

The method of ligation of the nerve stump through epineural anastomosis with three simple stitches in SL group and a single stitch in the SFS group was utilized aiming to reduce the collateral effects of suture (Biscola et al., 2017b), as well as to optimize the fibrin sealant use. Considering that a single stitch was used, it wouldn't be enough for a safe and adequate nerve reconstruction (Griffin et al., 2014; Maragh et al., 1990).

Torres et al. (2003), found that the association of the fibrin glue with a stitch provided good axonal alignment due to the introduction of less foreign material into the neural tissue and led to a lower formation of neuroma, thus reducing the use of suture, manipulation and degree of distortion between the nerve stumps.

After PNL, there is a neuromuscular destabilization, leading to an alteration of the contractile proteins of the muscle (Ferreira et al., 2004; Sultan et al., 2000) and on the pattern of distribution of pre and post-synaptic components (Pratt et al., 2013).

In this study, in DC group, nAChRs were distributed in “islands”, with typical rounded areas containing fragmentation and the morphometric data found in DC group confirm these alterations in nAChRs, with a decrease of the values in all the analyzed parameters, whose data must be related to fragmentation of nAChRs, leading to a synaptic failure and muscular weakness (Sieck et al., 2012; Suzuki et al., 2009).

Similar results were also described in conditions such as ageing (Apel et al., 2009; Balice-Gordon, 1997; Deschenes et al., 2013; Deschenes et al., 2010; Li et al., 2011; Suzuki et al., 2009; Valdez et al., 2010), diabetes (Marques and Neto, 2002), anesthetic injury (Marques et al., 2005; Minatel et al., 2001; Pissulin et al., 2017), muscular dystrophy (Banks et al., 2009; Lyons and Slater, 1991; Marques et al., 2007; Minatel et al., 2003; Pratt et al., 2013; Pratt et al., 2015; Torres and Duchon, 1987), after nerve lesion induced by crushing (Kawabuchi et al., 2001; Rich and Lichtman, 1989b) and tourniquet (Tu et al., 2017).

Regarding the nerve terminals, findings such as absence of integrity and the presence of irregular ramifications were also present in ageing (Kawabuchi et al., 2011; Valdez et al., 2010), after spinal muscular atrophy (Kariya et al., 2008; Kong et al., 2009; Martinez-Hernandez et al., 2013), after tourniquet use (Corrick et al., 2018), and in nerve lesion after crushing (Mozaffar et al., 2009; Su et al., 2018; Yuan et al., 2014).

In relation to the protein expression analyses, the value of MuSK did not show differences between the groups. On the other hand, in the MMP-3 and subunit  $\epsilon$  protein expressions, there was a decrease. In the S100, agrin, rapsyn and  $\alpha 1$  and  $\gamma$  subunits the values were higher on DC group in comparison to other experimental groups.

There are descriptions that other pathological states such as burns (Osta et al., 2010), sepsis (Liu et al., 2013; Wang et al., 2018), ageing (Apel et al., 2009), anesthetic injection (Pissulin et al., 2017), penicillin injection (Yu et al., 2017) and denervation (Campbell, 2008; Fischer et al., 1999; Yang et al., 2013; Yang et al., 2015), lead to the re-expression of the embryonic receptor (AChR  $\gamma$ ). In our study the inversion of the values between this  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunit confirms the compatibility of the characteristics of embryonic and denervated fibers. It could be directly related to the destabilization of the NMJ (Kalamida et al., 2007; Ma et al., 2007; Yang et al., 2013).

The increase found in the protein expression of subunit  $\alpha 1$  on DC group was also described in muscular dystrophy (Chen et al., 2000), ageing (Apel et al., 2009) and denervation (Fischer et al., 1999; Kostrominova et al., 2000). It may be related with the occurrence of the dispersion of these subunits along of sarcolemma (Ma et al., 2007). The similarity of obtained values in relation to these proteins is justifiable, considering that the rapsyn protein is intimately associated to nAChRs (Chen et al., 2016).

After denervation, SCs act as adhesion and axonal growth factors and increase in number (Auld and Robitaille, 2003; Love and Thompson, 1999; Sanes and Lichtman, 1999), which justifies the values of the protein expression of S100 observed in this study. SCs and the muscular cells release MMP-3, which is mediated by nerve impulse. The blocking of electrical activity through denervation, results in a reduced level of active MMP-3 on the NMJ (VanSaun et al., 2007).

Considering that agrin is degraded by MMP-3, the decrease of this enzyme promotes an increase on its protein expression (Chao et al., 2013; VanSaun et al., 2003; Werle and VanSaun, 2003). Chao et al. (2013), studying MMP-3 *knockout* rats, found that even 2 months after denervation, agrin and MuSK levels are still present. These data may justify the levels found in DC group.

In relation to SC group, the morphology observed through confocal microscopy showed a distribution of nAChRs in continuous branches named “*pretzel*” and entire nerve terminals that are classically observed and described in adult normal muscles (Balice-Gordon and Lichtman, 1993; Marques et al., 2000; Minatel et al., 2003; Walsh and Lichtman, 2003). This morphology was accompanied of the higher values of the morphometric data of the nAChRs, proving the integrity and stability of the neuromuscular structure.

After nerve reconstruction, SL and SFS groups presented morphology of the nAChRs as well as of the nerve terminals that were in-between the SC and DC groups, suggesting a morphological approximation with the control group. This is indicative that the techniques utilized permit reinnervation, confirming that the remodeling of the receptors depend on innervation on the moment of regeneration of muscular fibers (Li and Thompson, 2011; Marques et al., 2005; Rich and Lichtman, 1989a).

Regarding morphometry, the values of the relative planar area and of the motor endplate density are related to its degree of ramification (Sieck et al., 2012)

and fragmentation of nAChRs (Sieck et al., 2012; Suzuki et al., 2009), reflecting the index of complexity of the NJM. It showed the attempt of recovery of nAChRs after reconnection of the nerve stump in SF and SFS groups. Considering that the higher are the levels of relative planar area (Pissulin et al., 2017; Sieck et al., 2012) and of the motor endplate density (Deschenes et al., 2013; Deschenes et al., 2010; Deschenes et al., 2015; Pratt et al., 2013; Suzuki et al., 2009), the lower will be the fragmentation of nAChRs and vice versa.

The recovery may be justified by the values found on the expression of proteins S100, MMP-3, agrin, MuSK, rapsyn and  $\alpha 1$ ,  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits, whose values of SL and SFS groups were compatible with normality (similar to the control group).

The SCs (quantified by S100) contribute for the maintenance of the synaptic transmission efficiency and of its structures and also act on the NMJ regeneration (Nishimune and Shigemoto, 2018). As the damaged nerves are repaired, a SCs apoptosis occurs (Yang et al., 2008). This protein level value observed after the reconstruction indicate a reduction, whose values approached those of control group.

The molecular mechanisms involved in the organization of the NMJ include, amongst others, the release of agrin by the nerve terminals on the synaptic cleft. Agrin links to the Lrp4 receptor to active the MuSK receptor. It leads to stabilization and clustering of nAChRs by Dok-7 and other mechanisms that also involve the protein rapsyn (Nishimune and Shigemoto, 2018; Rudolf et al., 2016).

The agrin protein expression in SL and SFS groups showed a similarity of results with the SC group, confirming the nerve activity restoration in these groups, with a reestablishment of the neuromuscular supply to the muscles, that is fundamental to restore the function after a lesion (Zhang et al., 2016). The reestablishment of the nerve impulse leads to the control of the MMP-3 release by the SCs and it influences agrin levels (VanSaun et al., 2007).

In relation to the similarity of values in the protein expression of MuSK found in the experimental groups, it must be linked to the fact that its expression is innervation independent. This protein is preferentially expressed in the central region of the muscle and its standard contributes to determinate where the motor axons will grow and where the synapses will be formed (Kim and Burden, 2008).

The MuSK protein does not act only as a tyrosin kinase receptor to agrin, it initiates pathways that lead to post synaptic differentiation, but also as an cascade organizer, crucial for the compartmentalized signaling (Wu et al, 2010). This signaling

leads to a post synaptic specialization and induces cytosolic proteins such as Dok-7 and rapsyn to accumulate the nAChRs (Nishimune and Shigemoto, 2018).

Rapsyn is a protein that plays an essential role in the anchoring of post synaptic proteins, including nAChRs (Burden et al., 2018). In our study, the values of this protein expression and of the  $\alpha 1$  subunit in SL and SFS groups were similar to SC group and smaller than DC group. According to Chen et al. (2016) the relationship between rapsyn and nAChRs may be reciprocal.

The over-expression of rapsyn inhibits the grouping of nAChRs induced by agrin (Han et al., 1999; Sanes and Lichtman, 2001). Reduction of the rapsyn protein expression was observed in nAChRs-deficient mice (Schwarz et al., 2000; Witzemann et al., 1996). However, Bruneau et al. (2005) suggested that the nAChRs are necessary for the maintenance of the density of rapsyn on nAChRs aggregates in myotubes cell surface in culture (Witzeman et al., 1996; Schwartz et al., 2000).

After PNL, the levels of  $\alpha 1$  subunit are elevated immediately, triggering an increased expression of nAChRs in order to maintain muscular function (Adams et al., 1995; Gomez-Amaya et al., 2015). This premise is in accordance with the results found in DC group. This increase is probably associated with the dispersion of nAChRs over the sarcolemma; the similarity of SL and SFS values with SC group, on the other hand, suggests a stabilization of the NMJ structure and a return to the mature neuromuscular structure.

With the existence of a nerve reconnection, there is an amplification of electrical signals to the muscular fiber. Through the action potential in the muscle, the released ACh induces a nAChRs transcription decrease by muscular fiber. Then a nAChRs accumulation will start only in the synaptic area. It results in the ACh-dependent suppression in the transcription of nAChR subunit genes in the extra-synaptic nucleus (Ferraro et al., 2012; Sanes and Lichtman, 2001).

Associated to this, there is the  $\gamma$  subunit replace (extra junctional immature form, present in the embryonic denervated fiber) by the  $\epsilon$  subunit (junctional functional mature and innervated form) (Changeux and Edelstein, 1998; Lindstrom, 2000; Ma et al., 2007; Mishina et al., 1986; Schuetze and Role, 1987).

The  $\gamma$  subunit influences in a longer functional mean-time of the ionic channel opening, with smaller conductance and shorter half-life (Kramer et al., 2017). The  $\epsilon$  mature subunit, on the other hand, is related to a higher conductance and a shorter opening time of the ionic channel (Di Castro et al., 2007; Fucile et al., 2006; Pissulin

et al., 2017; Shen et al., 2016). The influx of  $\text{Ca}^{2+}$  through the subunits  $\gamma$  and  $\epsilon$  play an important role in the formation and function of the normal NMJ. The influx of  $\text{Ca}^{2+}$  contributes to model the muscular activity, regulating the activation of the depolarized  $\text{Na}^+$  channels that are voltage-dependent and repolarizes the  $\text{Ca}^{2+}$ - dependent  $\text{K}^+$  channels (Allard et al., 1996; Fucile et al., 2006; Young and Caldwell, 2005).

Some studies have shown promising results after the use of fibrin sealants, in bedsores (Gatti et al., 2011), in the repair of bone defects (Machado et al., 2015), in the regeneration of peripheral nerves (Buchaim et al., 2015; Félix et al., 2013; Martins et al., 2005) and in association with mesenchyme stem cells after sciatic nerve tubulization (Cartarozzi et al., 2015).

The innervation is fundamental for the muscle maturation developing and for its regeneration to retain its function.

Based on similarity of the results observed in reconstruction groups, it was possible to conclude that the CEVAP's fibrin sealant associated with a single stitch facilitate the nerve repair, promoting a return of nAChRs morphology and associated proteins to the mature pattern. The fibrin sealant associated with reduced stitches showed promissor with values related to immature receptor ( $\gamma$ ) smaller values than the only suture group.

## Referências

- Adams, L., Carlson, B.M., Henderson, L., Goldman, D., 1995. Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin, and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. *The Journal of cell biology* 131, 1341-1349.
- Allard, B., Bernengo, J.-C., Rougier, O., Jacquemond, V., 1996. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  changes and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel activation induced by acetylcholine at the endplate of mouse skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology* 494, 337-349.
- Apel, P.J., Alton, T., Northam, C., Ma, J., Callahan, M., Sonntag, W.E., Li, Z., 2009. How age impairs the response of the neuromuscular junction to nerve transection and repair: An experimental study in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 27, 385-393.
- Auld, D.S., Robitaille, R., 2003. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40, 389-400.
- Balice-Gordon, R.J., Lichtman, J.W., 1993. In vivo observations of pre-and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *Journal of Neuroscience* 13, 834-855.
- Balice-Gordon, R.J., 1997. Age-related changes in neuromuscular innervation. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine* 20, 83-87.
- Banks, G.B., Chamberlain, J.S., Froehner, S.C., 2009. Truncated dystrophins can influence neuromuscular synapse structure. *Molecular and Cellular Neuroscience* 40, 433-441.















